

Stoffflüsse in *Escherichia coli* TG1 unter aeroben, glucoselimitierten Bedingungen

Von der gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaft
(Dr. rer. nat)

genehmigte
DISSERTATION

von
Anke N. Kayser
aus Lübeck

1. Referent:	Prof. Dr. W.-D. Deckwer
2. Referent:	Prof. Dr. Th. Scheper, TU Hannover
eingereicht am:	22.10.1998
mündliche Prüfung (Disputation) am:	21.01.1999
Druckjahr:	1999

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit der Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge:

A. Kayser, K. Hellmuth, U. Rinas

Physiological consequences of (de-)coupling of NADH-oxidation with the respiratory energy output of *Escherichia coli*; (Poster) Dechema Jahrestagung; Wiesbaden 1996

A. Kayser, K. Hellmuth, U. Rinas

Is growth of *Escherichia coli* in glucose-limited aerobic chemostat cultures limited by cell- or energy-carbon supply?; (Poster) 8th European Congress of Biotechnology; Budapest, Hungary 1997

Die vorliegende Arbeit wurde von Dezember 1994 bis Oktober 1998 im Bereich Bioverfahrenstechnik der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig, angefertigt. Mein Dank gilt der VW-Stiftung, die im Rahmen des Projektes "Stoffflüsse in Mikroorganismen" die Finanzierung der Arbeit übernommen haben.

Prof. Dr. W.-D. Deckwer möchte ich meinen Dank aussprechen für das interessante Thema, die Betreuung und Unterstützung der Arbeit, sowie die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Bei Prof. Dr. T. Scheper, TU Hannover, möchte ich mich für die Übernahme des Korreferats bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. U. Rinas für die intensive fachliche Betreuung, die zahlreichen Diskussionen und den daraus resultierenden Anregungen während der Anfertigung dieser Arbeit.

Dr. K. Hellmuth danke ich für die Hilfe bei der Einarbeitung in das Thema und insbesondere bei der Durchführung der ersten Versuche.

Den beiden Praktikanten Jörn Plote und Daniela Konle danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei zahlreichen Kultivierungen.

Für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima möchte ich mich bei den (ehemaligen) Mitarbeitern der Arbeitsgruppe "Mikrobielle Systeme" bedanken, wobei ich ein besonderes Dankeschön an Sabine Marten für die Hilfe bei analytischen Problemen, Carsten Müller für seine Diskussionsbereitschaft, Michael Schmidt für die Behebung technischer Probleme und Jan Weber für die Hilfe bei der Erstellung des mathematischen Modells richten möchte.

Im Bereich Bioverfahrenstechnik fand ich während der gesamten Zeit zahlreiche Mitarbeiter, die mir bei der Lösung verschiedener Probleme behilflich waren. Daher möchte ich mich bei dem gesamten Bereich für die Unterstützung bedanken, insbesondere bei S. Brandt, Herrn Bischoff, St. Heiber, C. Hempel, U. Kies, K. Menzel und M. Schröder sowie A. Asmus und M. Ruffer (Sekretariat).

Meinen Eltern danke ich für die rückhaltlose Unterstützung während meines gesamten Werdegangs!

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Zielsetzung	1
2. Theoretische Grundlagen	5
2.1 Mikroorganismus	5
2.2 Bakterienwachstum	5
2.3 Stoffwechsel	7
2.3.1 Embden-Meyerhof-Parnas Weg	8
2.3.2 Pentosephosphatweg	8
2.3.3 Methylglyoxal - Nebenweg	9
2.3.4 Tricarbonsäurezyklus	9
2.3.5 Anaplerotische Reaktionen	11
2.3.6 Stoffwechselraten	11
2.4 Energiegewinnung	13
2.4.1 Reduktionsäquivalente	13
2.4.2 ATP-Gewinnung	14
2.4.3 Energetische Biomasseausbeute Y_{ATP} und Erhaltungskoeffizient m_E	15
2.4.4 ATP-Bildungsrate Q_{ATP}	17
2.4.5 Adenosinnucleotid-Pool	19
2.5 Stoffflußmodellierung	20
2.5.1 Flußberechnung	20
2.5.2 Sensitivitätsanalyse	22
2.5.3 Biomassebildung	23
2.5.4 Vereinfachung des Stoffwechselnetzwerks	24
2.6 Proteinproduktion mittels rekombinanter <i>Escherichia coli</i>	24
2.6.1 Basischer Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF)	25
2.6.2 Inclusion Bodies	25
3. Material und Methoden	27
3.1 Mikroorganismus	27

3.1.1 Stammhaltung	27
3.2 Medium	28
3.3 Kontinuierliche Kultivierung	29
3.3.1 Bioreaktor	29
3.3.2 Versuchsaufbau und Versuchsführung	29
3.3.3 On-line Analytik	31
3.4 Hochzelldichtekultivierung	31
3.4.1 Bioreaktor	31
3.4.2 Versuchsführung	32
3.5 Analytische Methoden	34
3.5.1 Probenahme	34
3.5.2 Bestimmung der Zellkonzentration	35
3.5.2.1 Optische Dichte	35
3.5.2.2 Biotrockenmasse	36
3.5.2.3 Zählkammer	36
3.5.3 Elementaranalyse	37
3.5.4 Ammoniumbestimmung	38
3.5.5 Organische Säuren und Glucose	38
3.5.6 Extraktion und quantitative Bestimmung intrazellulärer Nucleotide ..	39
3.5.7 Extraktion für die Methylglyoxal-Bestimmung	40
3.5.8 Quantitative Bestimmung von bFGF	41
3.6 Berechnung von Prozeßparametern	42
3.6.1 Ertragskoeffizienten	42
3.6.2 Massenbilanzen	43
4. Ergebnisse und Diskussion	45
4.1 Fließgleichgewicht im Chemostaten	45
4.1.1 Wachstumskinetik	45
4.1.2 Organische Säuren	47
4.1.3 Elementare Zellzusammensetzung	49
4.1.4 Ertragskoeffizienten und Bilanzen	50
4.1.5 Glucoseaufnahme rate	57

4.1.6 Atmungsaktivität	59
4.1.7 Energiestoffwechsel	61
4.1.7.1 ATP-Bildungsrate	62
4.1.7.2 Adenylatnucleotide	65
4.1.7.3 AEC	67
4.1.8 Glucoselimitierung im Chemostaten	69
4.1.9 Stoffflußmodellierung	70
4.2 Dynamische Zustände im Chemostaten	75
4.2.1. Veränderungen der Durchflußrate	75
4.2.1.1 Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxidbildung	75
4.2.1.2 Glucose und organische Säuren	76
4.2.1.3 Methylglyoxal	78
4.2.2 Energiestoffwechsel	79
4.2.3 Oszillation	83
4.2.3.1 Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxidbildungsrate	83
4.2.3.2 AEC	86
4.2.3.3 Methylglyoxal	88
4.3 Hochzelldichtekultivierung	92
 5. Zusammenfassung	 100
 6. Literaturverzeichnis	 104
 7. Anhang	 119
7.1 Abkürzungen und Formelzeichen	119
7.1.1 Abkürzungen	119
7.1.2 Symbole	121
7.2 Tabellen	123
7.3 Stoffflußmodellierung	131
7.3.1 Reaktionen des biochemischen Stoffwechselmodells	131

1. Einleitung und Zielsetzung

In der heutigen Biotechnologie spielt die Produktion zelleigener oder zellfremder Stoffe, sowie der Abbau von Schadstoffen durch rekombinante Organismen eine wichtige Rolle. An den verwendeten Wirtsorganismus werden verschiedene Anforderungen gestellt, bei denen unter anderem die Pathogenität, das Vorhandensein von klonierten Vektoren sowie die Einfachheit des Klonens, ein weites Substratspektrum, eine gewisse Robustheit gegenüber der Umgebung und die Fähigkeit mit kostengünstigen Substraten zu wachsen eine wichtige Rolle spielen (Cameron und Tong, 1993). Außerdem ist eine gute Kenntnis der Genetik und Physiologie des verwendeten Organismus unumgänglich.

Der Laborstamm *Escherichia coli* K12, der sich durch die Abwesenheit von Pathogenitäts- oder Virulenzfaktoren (Hacker et al., 1991) in die Risikogruppe 1 (kein Risiko) einsortieren läßt, erfüllt viele der gestellten Anforderungen, so daß häufig gentechnologische Arbeiten mit diesem Stamm durchgeführt werden. Dabei findet *Escherichia coli* nicht nur Anwendung in der Grundlagenforschung sondern wird auch für viele Prozesse in der praxisorientierten Biotechnologie genutzt. Mit Hilfe rekombinanter *Escherichia coli* K12 Stämme konnten sowohl die Produktion zelleigener Produkte gesteigert als auch die Produktion zellfremder Substanzen angeregt werden. Außerdem konnten durch Modifikation zum einen die Zelleigenschaften beeinflußt werden, so daß z.B. Resistenzen gegen toxische Stoffe entstanden und zum anderen konnte der Abbau von chemischen Substanzen angeregt werden. Die Tabelle 1 gibt eine kurze Übersicht über einige gentechnische Veränderungen bei *E. coli* Stämmen und deren Auswirkungen.

Tabelle 1: Gentechnisch veränderte *Escherichia coli* K12 Stämme und deren Produkte bzw. Abbausubstanzen

Produkt	Kommentar	Referenz
<u>zelleigene Produkte</u>		
Ethanol	Gene für Pyruvatdecarboxylase und Alkoholdehydrogenase <i>Zymomonas mobilis</i>	Ingram et al., 1987
Ethanol	Pyruvatdecarboxylase aus <i>Zymomonas mobilis</i> und Überexpression der Alkoholdehydrogenase	Ingram und Clark, 1991
Biotin	Fünf von Substratinhibierung befreite Biotin-Synthesegene kloniert	Ifuku et al., 1986
L-Phenylalanin	Expression aller Phenylalaningene; neuer Promotor für <i>pheA</i> ; Entfernung des Repressorproteins;	Backman, 1989
<u>zellfremde Produkte</u>		
Polyhydroxybutyrat (PHB)	PHB Biosynthesegene aus <i>Alcaligenes eutrophus</i>	Slater et al., 1992
Wachstumsfaktoren	pCYTEXP1-Plasmid mit der humanen bFGF-Gensequenz	Seeger, 1995
	pTRLBT1-Plasmid mit der humanen EGF-Gensequenz	Shimizu et al., 1995
<u>Biodegradierung</u>		
Abbau von Trichlorethan	Gene aus <i>Pseudomonas mendocina</i>	Winter et al., 1989
Polychloriertes Biphenyl (PCB)	Gene aus <i>Pseudomonas spec.</i>	Mondello, 1989
<u>Modifikation der Zelleigenschaften</u>		
Resistenz gegen Methylglyoxal	Überexpression von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Genen	Murata et al., 1985

Häufig wird versucht, die Überproduktion einer Substanz zu erreichen durch die Überexpression der beteiligten Enzyme oder bei einem Fremdprodukt durch die Transformation des Wirtsorganismus mit den Genen, die das gewünschte Produkt kodieren. Dies führt oft nicht zu der erhofften Ertragssteigerung, da die gentechnischen Veränderungen zu Beeinträchtigungen der Stoffflüsse im Primärmetabolismus der Bakterien führen. Diesen Änderungen wirkt der Wirtsorganismus unter anderem durch die Kontrolle der Enzyme entgegen. Es ist also notwendig, die komplexen, nicht-linearen Zusammenhänge des Bakterienstoffwechsels zu verstehen und gezielte Verbesserung vorzunehmen, die die Starrheit des Stoffwechsels lösen oder umgehen (Stephanopoulos und Vallino, 1991).

Die Quantifizierung der metabolischen Flüsse spielt eine zentrale Rolle in der Untersuchung der Physiologie von Organismen, da das Ziel des Metabolic Engineering die Umleitung eines möglichst großen Teils des Substrats zum gewünschten Produkt ist (Nissen et al., 1997). In die Berechnung intrazellulärer Flüsse fließen die Messungen extrazellulärer Flüsse ein, wobei dies meistens die Substrataufnahmeraten und Produktbildungsraten sind (Jørgensen et al., 1995). Neben den üblicherweise gemessenen Stoffflüssen spielt die Energetik des bakteriellen Wachstums eine wesentliche Rolle, die häufig zu wenig Beachtung findet. Die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Substratverwendung, ATP-Erzeugung, Biomassebildung und Produktbildung kann behilflich sein bei der Vorhersage maximal erreichbarer Ausbeutekoeffizienten und der Klärung des Einflusses der Kultivierungsbedingungen auf die Produktivität (Stouthamer und van Verseveld, 1987).

Das Studium der Bakterienphysiologie wird erleichtert durch die Anwendung der kontinuierlichen Kultivierung, in der die äußeren Bedingungen konstant gehalten werden können, so daß sich das System in einem Fließgleichgewicht befindet. Im substratlimitierten Chemostaten läßt sich die Wachstumsrate kontrollieren, so daß eine genaue Untersuchung der Physiologie während des exponentiellen Wachstums ermöglicht wird. Das Betreiben des Chemostaten ist relativ einfach, da sich bei einer konstanten Zuflußgeschwindigkeit nach einiger Zeit eine Selbstregulation des Systems einstellt, daher bietet es sich als Werkzeug für die Untersuchung des Bakterienstoffwechsels an.

Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Stoffflüsse bei aerob wachsenden *Escherichia coli*. Dazu erfolgte eine quantitative Erfassung stöchiometrischer und energetischer Daten, um nähere Erkenntnisse über den aeroben Stoffwechsel von Glucose durch *Escherichia coli* zu gewinnen. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf dem Kohlenstoff- und Energiestoffwechsel der Bakterien während der kontinuierlichen Kultivierung unter aeroben, glucoselimitierten Bedingungen. Die extrazellulär meßbaren Substanzen - Glucose, Biomasse, Kohlendioxid, Sauerstoff und organische Säuren - dienten der Bestimmung von Ertragskoeffizienten und Stoffwechselraten. Die Massenbilanzen einzelner Substanzen wurden genutzt, die Konsistenz der Meßwerte zu überprüfen. Mit Hilfe der gemessenen Stoffwechselraten und eines stöchiometrischen Modells der biochemischen Stoffwechselwege konnte die intrazelluläre Stoffflußverteilung in Abhängigkeit von der Wachstumsrate bestimmt werden.

Ein weiterer, wichtiger Punkt war die Messung des intrazellulären Adenylatnucleotidpools, der Aufschluß über den Energiestatus der Zellen gab. Der Energiegehalt der Zellen hat einen direkten Einfluß auf den Stoffwechsel der Bakterien, da viele der am Glucosestoffwechsel beteiligten Enzyme durch ATP aktiviert oder inhibiert werden (Atkinson, 1977).

Weitere Einblicke in die physiologischen Möglichkeiten von *Escherichia coli* wurden durch die Untersuchung der Reaktion auf Veränderungen des Systems gewonnen. Die Änderungen extrazellulärer und einiger intrazellulärer Stoffflüsse wurden beim Übergang von einem Fließgleichgewicht in den anderen nach Erhöhen oder Herabsetzen der Durchflußrate untersucht. Ein weiterer instabiler Zustand - die Oszillation - wurde genauer überprüft, um die möglichen Ursachen für die Schwingungen zu ermitteln.

Während der Hochzelldichtekultivierung eines rekombinanten *Escherichia coli* TG1 Stammes wurde der Energiestoffwechsel untersucht. Bei dem bFGF produzierenden *E. coli* TG1:pλFGFB erfolgte die Induktion der Proteinsynthese durch einen Temperatursprung. Die erhöhte Temperatur sowie die Produktion des zellfremden Proteins beeinflussten die Physiologie des Wirtsorganismus (Rinas, 1997). Daher wurde der AEC der Bakterien vor und nach der Hitzeinduktion untersucht, um eine Aussage über den Energiezustand der Zellen zu machen.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Mikroorganismus

Das gram-negative, stäbchenförmige Bakterium *Escherichia coli* gehört zu der Familie der Enterobacteriaceae. Der Laborstamm *E. coli* K12 zeichnet sich durch eine geringe Virulenz, einfache Stammhaltung und seine Fähigkeit, auf synthetischen Medien schnell zu wachsen, aus. Bei *Escherichia coli* sind die Stoffwechselwege einschließlich der Zwischenprodukte und Enzyme sowie die Mechanismen der Enzymregulation und ihre Kopplung an Signaltransduktionswege weitestgehend erforscht. Es existiert eine umfassende Proteinbank in Form von O'Farrell-Gelen (Neidhardt, 1986). Die Genomsequenz ist inzwischen vollständig aufgeklärt (Karp et al., 1997; Blattner et al., 1997) und es sind unzählige Mutanten für ca. 1200 Gene vorhanden.

2.2 Bakterienwachstum

Die Wachstumskinetik von Enterobakterien läßt sich durch verschiedene Ansätze beschreiben, wobei Monod (1942) als einer der ersten die Beziehungen zwischen Wachstumsrate μ [h^{-1}] und Substratkonzentration S [g l^{-1}] beschrieb, unter Berücksichtigung der maximalen Wachstumsrate μ_{\max} [h^{-1}], und der Substratkonzentration K_S [g l^{-1}] bei halbmaximaler Wachstumsrate:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \quad (2.1)$$

Bei der Bestimmung des Wachstums muß bei den meisten Organismen zwischen Zunahme der Zellzahl und der Zellmasse unterschieden werden. Da *E. coli* aber zu den sogenannten Standardzellen gehört (Schlegel, 1984), konnten diese Parameter gleichgesetzt werden, so daß

sowohl die Zellzahl als auch die Biomasse zur Ermittlung der Wachstumsrate μ herangezogen werden konnten.

Die meisten Versuche wurden im Chemostaten durchgeführt, wo für die Änderung der Bakteriendichte dX/dt [$g\ h^{-1}$] gilt:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - DX \quad (2.2)$$

Dabei steht t für die Zeit [h], X für die Biomasse [$g\ l^{-1}$], D für die Durchflußrate [h^{-1}] und μ [h^{-1}] für die Wachstumsrate, die sich aus der Flußrate F [$l\ h^{-1}$] und dem Kulturvolumen V_L [l] berechnen läßt:

$$D = \frac{F}{V_L} \quad (2.3)$$

Im Fließgleichgewicht ist $dX/dt = 0$, so daß gilt

$$D = \mu \quad (2.4)$$

Die Biomasse X [$g\ l^{-1}$] läßt sich mit Hilfe des Biomasseausbeutekoeffizienten $Y_{X/S}$ [$g_{BTM}\ g_S^{-1}$], des Erhaltungskoeffizienten $m_S = 0,005\ g\ l^{-1}$ (Neijssel et al., 1986), der Durchflußrate D [h^{-1}] und der verbrauchten Glucosekonzentration S [$g\ l^{-1}$] berechnen:

$$X = \frac{S}{\frac{1}{Y_{X/S}^{max}} + m_S \cdot \frac{1}{D}} \quad (2.5)$$

2.3 Stoffwechsel

In dieser Arbeit wurden die Stoffflüsse bei *Escherichia coli* in einem vollsynthetischen Medium unter aeroben Bedingungen mit Glucose als einziger Kohlenstoffquelle untersucht. Die Umsetzung der Glucose läßt sich in zwei Abschnitte unterteilen: Glucoseabbau (= Katabolismus) und Synthesestoffwechsel (= Anabolismus). Die Glucose wird im Katabolismus in kleinere Bruchstücke zerteilt, die dann als Vorstufen für polymere Makromoleküle dienen. Ein Teil der Glucose wird vollständig zu Kohlendioxid und Wasser oxidiert, wobei die freigesetzte Energie genutzt wird, die in allen Organismen vorhandene energiereiche Verbindung Adenosintriphosphat (ATP) zu bilden. Einige der Metabolite aus dem Katabolismus werden im Anabolismus unter Energieverbrauch zum Aufbau von Biopolymeren (Proteine, RNA, DNA) genutzt und dienen somit der Biomassebildung. Dadurch bekommt die Glucose eine doppelte Funktion für die Zelle: Sie dient sowohl als Kohlenstoff- als auch als Energiequelle.

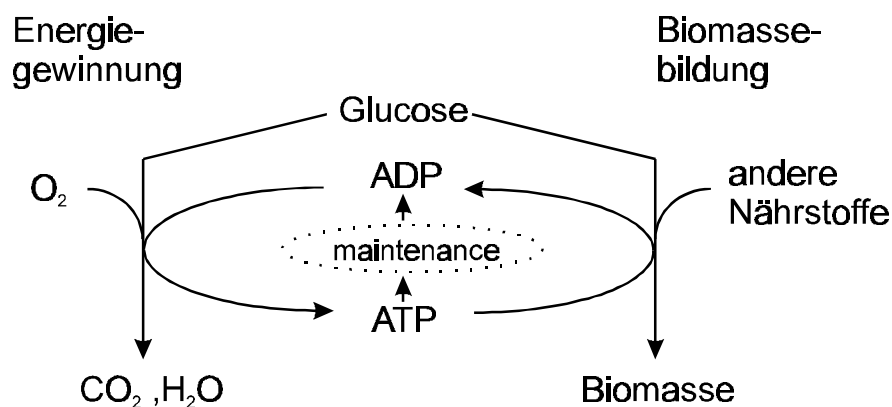


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Stoffwechsels

Die Aufnahme der Glucose, die mit einer Phosphorylierung gekoppelt ist, erfolgt bei *Escherichia coli* mit Hilfe des Phosphoenolpyruvat:Glucose-Phosphotransferase Systems. Dabei kommt es zur vollständigen Phosphorylierung der Glucose, so daß in der Zelle ausschließlich Zuckerphosphat vorliegt (van der Zee et al., 1996). Danach wird die aufgenommene, phosphorylierte Glucose über verschiedene Stoffwechselwege oxidiert: Embden-Meyerhof-Parnas Weg, Pentosephosphatweg, Methylglyoxalnebenweg und Tricarbonsäurezyklus. Die ersten drei Wege sind teilweise parallel verlaufende Stoffwechselwege (s. Abb. 2).

2.3.1 Embden-Meyerhof-Parnas Weg

Der Hauptteil der Glucose wird über den Embden-Meyerhof-Parnas Weg (EMP; Glycolyse; Fructosebisphosphatweg), dem wichtigsten Abbauweg für Glucose, zu Pyruvat umgewandelt. Der erste, energieverbrauchende Abschnitt des Embden-Meyerhof-Parnas Wegs dient der Umwandlung der Glucose zu Fructose-1,6-bisphosphat durch Isomerisierung und Phosphorylierung. Diesem Teil folgt die Spaltung des C6-Körpers in zwei C3-Körper, die zu Pyruvat oxidiert werden, wobei NAD reduziert und ATP durch Substratkettenphosphorylierung gewonnen wird (Schlegel, 1984). Anschließend wird das Pyruvat zu Acetyl-Coenzym A oxidiert, welches dann im Tricarbonsäurezyklus vollständig zu Kohlendioxid oxidiert wird. In dem Embden-Meyerhof-Parnas Weg werden 2 ATP durch Substratkettenphosphorylierung gewonnen und 2 NAD reduziert.

2.3.2 Pentosephosphatweg

Der Pentosephosphatweg (PP-Weg) ist ein Nebenweg, welcher der Bereitstellung wichtiger Ausgangssubstanzen für die Biosynthese - insbesondere für die Nucleotidsynthese - dient (Woods, 1985). Im oxydativen Abschnitt wird aus Glucose-6-phosphat durch mehrere Reaktionen unter Abspaltung von Kohlendioxid Ribulose-5-phosphat, wobei NADP reduziert wird. Der Stofffluß durch den PP-Weg wird durch das Enzym Glucose-6-phosphatdehydrogenase kontrolliert (Bonsignore, 1972). Das Enzym ist bei *Escherichia coli* NADP-spezifisch, so daß auch die NADPH₂-Bildung durch dieses Enzym kontrolliert wird. Im nicht-oxydativen Teil ist der wichtigste Metabolit Ribose-5-phosphat, welches als Monomer für die Synthese von RNA, DNA und Nucleotid-Coenzymen dient. Dieser C5-Körper kann über verschiedene Zwischenstufen aus Fructose und Glycerinaldehyd oder aus Ribulose-5-phosphat synthetisiert werden. Durch das Transaldolase-Transketolase-System besteht eine reversible Verbindung zwischen dem Pentosephosphatweg und dem Embden-Meyerhof-Parnas Weg, so daß durch das Zusammenspiel der beiden Wege der Spiegel von NADPH, ATP und Bausteinen wie Ribose-5-phosphat und Pyruvat geregelt werden kann (Stryer, 1988).

2.3.3 Methylglyoxal - Nebenweg

Alternativ zum Embden-Meyerhof-Parnas Weg können viele Mikroorganismen den Methylglyoxal-Nebenweg nutzen, um aus Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) Pyruvat zu bilden. Die Enzyme dieses Stoffwechselweges (Methylglyoxal-Synthase, Glyoxalase I und II) sind konstitutiv (Cooper und Anderson, 1970). Durch Eliminierung des Phosphats wird Methylglyoxal (MGO) gebildet, welches dann über Lactat zu Pyruvat oxidiert wird, wobei keine Substratkettenphosphorylierung stattfindet. Im Gegensatz zum Embden-Meyerhof-Parnas Weg wird dadurch Pyruvat, das eine wichtige Vorstufe zur Bildung von Makromolekülen darstellt, mit einem geringeren Energiegewinn produziert.

Das gebildete Methylglyoxal wirkt schon ab einer relativ niedrigen Konzentration als Zellgift, welches das Wachstum durch Inhibierung der DNA-Initiation und durch Inhibierung der Protein-Biosynthese hemmt (Fredberg et al., 1971; Ackermann et al., 1974; Fraval und McBrien, 1979; Inoue und Kimura, 1995). Ferguson et al. (1996) beobachteten, daß schon Konzentrationen von $c > 0,3 \text{ mmol l}^{-1}$ das Wachstum hemmten und bei externen Konzentration über $0,6 \text{ mmol l}^{-1}$ der Zelltod eintrat. Der Abbau dieses Metabolits ist daher sehr wichtig, so daß Enterobakterien verschiedene Abbauewege für Methylglyoxal besitzen (Misra et al., 1995; 1996). Die Funktion dieses Alternativ-Stoffwechselweges in der Zelle ist bisher rein spekulativ. Eine mögliche Aufgabe des MGO-Nebenweges könnte das Entkoppeln von Anabolismus und Katabolismus sein oder aber der Nebenweg dient als Wachstumsregulator (Cooper, 1984). Ebenso ist eine Funktion als Kontrollmechanismus des Embden-Meyerhof-Parnas Weg möglich, da das erste Enzym des Nebenweges (MGO-Synthase) durch die Konzentration von DHAP und anorganischem Phosphat reguliert wird (Hopper und Cooper, 1971).

2.3.4 Tricarbonsäurezyklus

Der der Decarboxylierung des Pyruvats anschließende Tricarbonsäurezyklus (TCC; Krebszyklus; Zitronensäure- oder Citratzyklus) dient zum einen der vollständigen Oxidation des C2-Körpers unter Abspaltung von Wasserstoff und zum anderen kommt ihm die Funktion eines Verteilerkreises für Monomere zu (Baldwin und Krebs, 1981). Der TCC-Zyklus beginnt mit der

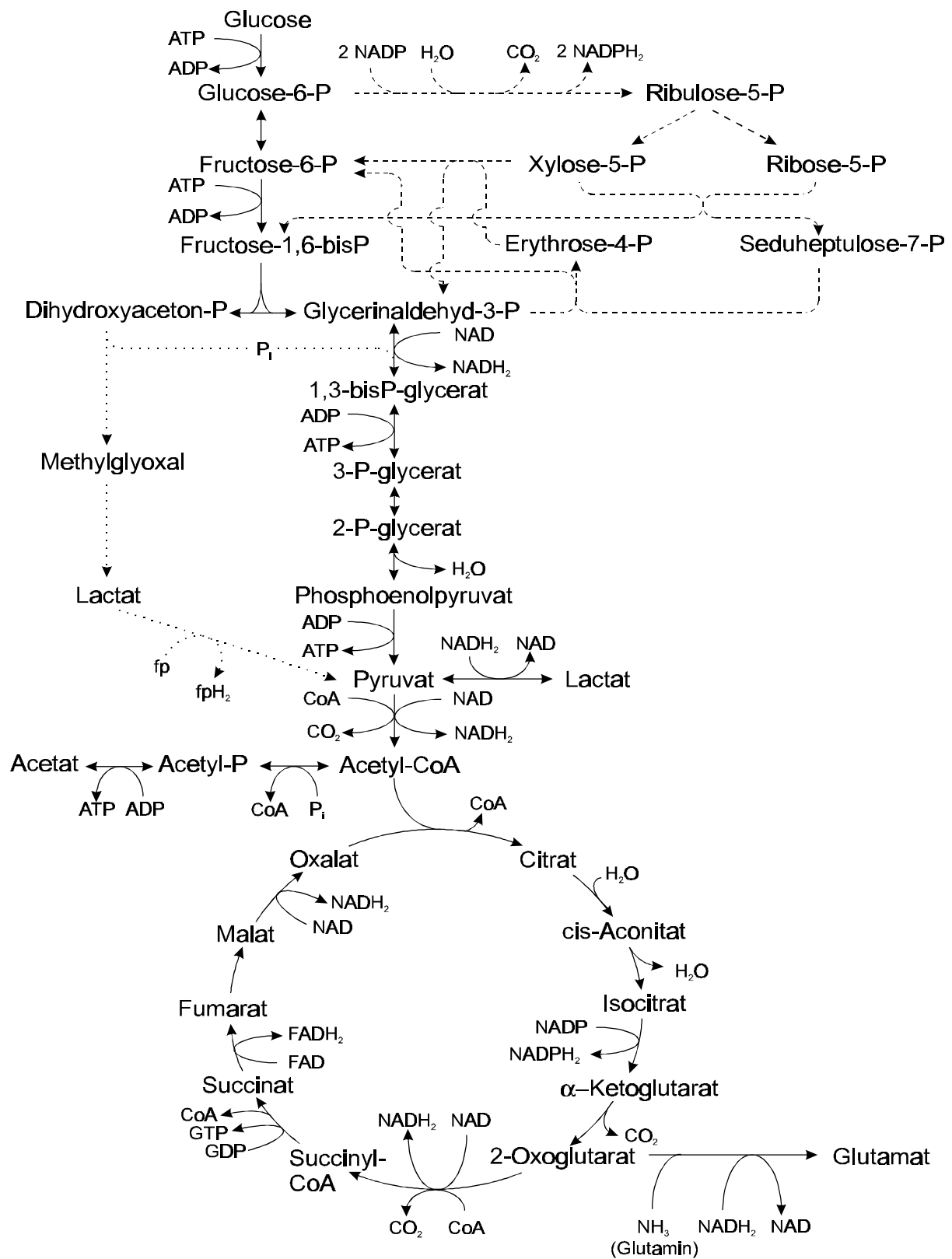


Figure 2: Darstellung einiger Stoffwechselwege des Glucosemetabolismus bei *Escherichia coli* (—) Embden-Meyerhof-Parnas Weg und Tricarbonsäurezyklus; (----) Pentosephosphat-Weg; (.....) Methylglyoxal-Nebenweg

Kondensation von Acetyl-CoA und Oxalat zu Citrat. Dieser C6-Körper wird durch zweifache Decarboxylierung und verschiedene Isomerisierungs-, Hydratisierungs- und Oxidationsschritte wieder zu Oxalat umgewandelt, so daß ein Kreislauf entsteht. Beim Durchlaufen dieses zyklischen Stoffwechselweges werden mehrere Reduktionsäquivalente - 2 NAD; 1 NADP und 1 FAD - reduziert, die dann durch die Oxidation in der Atmungskette der Energiegewinnung dienen. Außerdem entsteht durch Substratkettenphosphorylierung GTP, das energetisch dem ATP gleicht. Der Stofffluß durch den TCC wird durch die Citratsynthase kontrolliert, welche die Kondensation des Acetyl-CoA mit Oxalat katalysiert (Beeckmans, 1984).

2.3.5 Anaplerotische Reaktionen

Da einige der Intermediate des TCC z.B. α -Ketoglutarat als Monomere zur Synthese von Biopolymeren abgezogen werden, sind Auffüllreaktionen notwendig. Eine der wichtigsten anaplerotischen Reaktion bei *Escherichia coli* ist die Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat zu Oxalat (Gottschalk, 1978). Einen weiteren wichtigen anaplerotischen Reaktionsweg stellt der Glyoxylat-Bypass dar (Holms, 1986), in dem Isocitrat und Acetyl-CoA zu Malat und Succinat reagieren. Dieser Bypass ermöglicht *E. coli* das Wachstum auf Essigsäure, spielt aber bei der Kultivierung mit Glucose als C-Quelle keine Rolle (Stryer, 1988).

2.3.6 Stoffwechselraten

Einige der Metabolite können extrazellulär gemessen werden, da sie entweder von der Zelle erst aufgenommen werden müssen und dann verbraucht werden (Glucose, Sauerstoff, Ammonium) oder sie werden nach der Bildung in der Zelle ausgeschieden (Kohlendioxid, Acetat). Für diese Metabolite lassen sich volumetrische und spezifische Bildungs- bzw. Verbrauchsraten berechnen. Die volumetrischen Raten Q werden in der Regel in $\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$ angegeben und die spezifischen q mit $\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$, wobei der Zusammenhang zwischen den beiden Parameter mit Hilfe der Biomasse X [g l^{-1}] durch folgende Gleichung beschrieben wird:

$$q_s = \frac{Q_s}{X} \quad (2.6)$$

Aus den gemessenen Konzentrationen c [mol l⁻¹] lassen sich folgende volumetrische Raten bestimmen, wobei die Biomassebildungsrate Q_{BTM} als einzige in g l⁻¹ h⁻¹ angegeben wird:

$$\text{Glucoseaufnahmerate } Q_{Glc}: \quad Q_{Glc} = D \cdot (c_{Glc}^E - c_{Glc}^A) \quad (2.7)$$

$$\text{Biomassebildungsrate } Q_{BTM}: \quad Q_{BTM} = D \cdot X \quad (2.8)$$

$$\text{Ammoniumverbrauchsrate } Q_{NH_3}: \quad Q_{NH_3} = D \cdot (c_{NH_3}^E - c_{NH_3}^A) \quad (2.9)$$

$$\text{Acetatbildungsrate } Q_{ac}: \quad Q_{Ac} = D \cdot c_{Ac} \quad (2.10)$$

Die volumetrische Sauerstoffaufnahmerate Q_{O_2} [mol l⁻¹ h⁻¹] und die Kohlendioxidbildungsrate Q_{CO_2} [mol l⁻¹ h⁻¹] können aus den ermittelten Anteilen des Abgases mit Hilfe folgender Gleichung berechnet werden:

$$Q_{O_2} = \frac{V_G}{V_L - V_N} \cdot \left(c_{O_2}^E - c_{O_2}^A \cdot \frac{1 - c_{O_2}^E - c_{CO_2}^E}{1 - c_{O_2}^A - c_{CO_2}^A} \right) \quad (2.11)$$

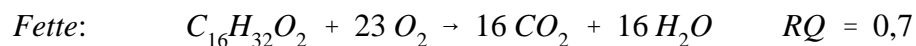
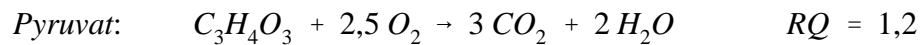
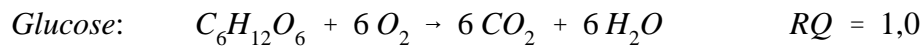
$$Q_{CO_2} = \frac{V_G}{V_L \cdot V_N} \cdot \left(c_{CO_2}^A \cdot \frac{1 - c_{O_2}^E - c_{CO_2}^E}{1 - c_{O_2}^A - c_{CO_2}^A} - c_{CO_2}^E \right) \quad (2.12)$$

Der erste Teil der Gleichung dient dabei der Berechnung der Begasungsrate aus dem Kulturvolumen V_L [l], dem Volumen des Gases unter Normbedingungen V_N [l mol⁻¹] und dem eingestellten Begasungsvolumen V_G [l h⁻¹]. Der zweite Teil der Gleichung umfaßt die Berechnung der Konzentrationen c [mol mol⁻¹] aus dem ein- (E) und dem ausströmendem (A) Gas.

Aus den molaren Stoffwechselraten läßt sich der respiratorische Quotient RQ [mol_{CO₂} mol_{O₂}⁻¹] ermitteln:

$$RQ = \frac{Q_{CO_2}}{Q_{O_2}} \quad (2.13)$$

Der respiratorische Quotient gibt einen indirekten Anhaltspunkt über die Natur des metabolisierten Substrats und des gebildeten Produkt bzw. deren Oxidationsgrade.



Bei der vollständigen Oxidation der Glucose zu Kohlendioxid hat der RQ einen Wert von 1,0, während die Metabolisierung eines anderen Substrates z.B. Pyruvat oder eines Speicherstoffes eine Änderung des RQ bewirkt.

2.4 Energiegewinnung

Der Katabolismus dient neben der Bereitstellung von Monomeren für den Anabolismus der Gewinnung von Energie aus den energiereichen Bindungen des Zuckers. Dabei wird durch die enzymkatalysierten Reaktionen in der Zelle die auftretende Energie in eine biochemisch verwertbare Energieform, das Adenosintriphosphat (ATP), umgewandelt. Das ATP ist keine Form der Energiespeicherung, sondern dient ausschließlich der Übertragung von Energie von den energiegewinnenden zu den energieverbrauchenden Reaktionen (Gottschalk, 1978). Das ATP wird zum Teil durch Substratkettenphosphorylierung produziert, aber der weitaus größere Anteil entsteht unter aeroben Bedingungen durch die Elektronentransportphosphorylierung in der oxydativen Atmungskette.

2.4.1 Reduktionsäquivalente

Die Reduktionsäquivalente spielen eine wichtige Rolle als Elektronentransporter zwischen dem Katabolismus, in dem die Reduktionsäquivalente bei der Oxidation der Glucose entstehen, und der oxydativen Atmungskette und der Biomassesynthese. Wichtigster Elektronenakzeptor ist

dabei das Nicotinamidadenindinucleotid (NAD), aber auch Flavinadenindinucleotid (FAD) und Flavinmononucleotid (FMN) spielen eine wichtige Rolle als Reduktionsäquivalente (Stryer, 1988). Enzyme, die FAD oder FMN als prosthetische Gruppe enthalten, werden als Flavoproteine bezeichnet (fp) und dienen ebenfalls dem Elektronentransport. Das reduzierte NADH_2 transportiert die Elektronen sowohl zur Atmungskette als auch zu anabolen Reaktionen, während das reduzierte, phosphorylierte NADPH_2 ausschließlich als Elektronendonator in der Biosynthese dient. Das für die Biomasse-Synthese wichtige NADPH_2 und das NADH_2 sind aus energetischer Sicht äquivalent. Da bei *Escherichia coli* die Transdehydrogenase aktiv ist, welche die reversible Reduktion von NAD durch NADPH_2 katalysiert (Hu et al., 1995), können die beiden Parameter in dem Term NAD(P)H_2 zusammengefaßt werden.

Durch die folgenden Gleichungen lassen sich die Bildungsrate $Q_{\text{NAD(P)H}}$ [$\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$] und die Verbrauchsrate $Q_{\text{NAD(P)H}}^*$ [$\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$] der Reduktionsäquivalente aus der CO_2 -Bildungsrate Q_{CO_2} [$\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$] berechnen:

$$Q_{\text{NAD(P)H}_2} = \frac{Q_{\text{CO}_2}}{\alpha_C} \cdot Y_{\text{NAD(P)H}_2/S} \quad (2.14)$$

$$Q_{\text{NAD(P)H}_2}^* = Q_{\text{O}_2} \cdot \frac{Y_{\text{NAD(P)H}_2/\text{O}_2} \cdot Y_{\text{NAD(P)H}_2/S}}{Y_{\text{RE/S}}} \quad (2.15)$$

wobei α_C den Anteil des Kohlenstoffs im Substrat [$\text{mol}_C \text{mol}_{\text{BTM}}^{-1}$] angibt. Außerdem werden die Ausbeutekoeffizienten Y [mol mol^{-1}] an NAD(P)H_2 pro verbrauchter Glucose ($Y_{\text{NAD(P)H}_2/S}$) bzw. pro verbrauchtem Sauerstoff ($Y_{\text{NAD(P)H}_2/\text{O}_2}$) und der Ausbeutekoeffizient der reduzierten Reduktionsäquivalenten pro verbrauchtem Substrat ($Y_{\text{RE/S}}$) berücksichtigt.

2.4.2 ATP-Gewinnung

Ein Teil des ATPs entsteht direkt durch Substratkettenphosphorylierung, während der Hauptteil in der Atmungskette entsteht. In der Atmung werden die im Katabolismus reduzierten Reduktionsäquivalente (NADH_2 ; FADH_2 , nicht aber NADPH_2) oxidiert und der dadurch

entstehende Protonengradient wird zur Bildung von ATP genutzt.

Ein wichtiger Quotient, um die Energieausbeute zu errechnen, ist der P/O-Quotient, der das Verhältnis von produziertem ATP pro reduziertem Sauerstoff angibt ($\text{mol}_{\text{ATP}} \text{mol}_{\text{O}_2}^{-1}$). Da bei *Escherichia coli* zwei Phosphorylierungsstellen in der Atmungskette vorhanden sind, wird der P/O-Quotient oft mit 2 angegeben (Schlegel, 1984). Einige Autoren haben indes gezeigt, daß diese Angabe nicht unbedingt stimmt, so werden für *E. coli* auch Werte von P/O = 1 (Hempfling und Mainzer, 1975); P/O = 1,33 (Stouthamer, 1977) oder P/O = 3 (Kashket, 1982) angegeben. Diese Diskrepanz zwischen dem mechanistischen Wert und den experimentell gewonnenen Quotienten hängt damit zusammen, daß die Oxidation der Reduktionsäquivalente bei *Escherichia coli* nicht notwendigerweise mit einer Phosphorylierung gekoppelt ist (Anraku und Gennis, 1987).

2.4.3 Energetische Biomasseausbeute Y_{ATP} und Erhaltungskoeffizient m_E

Das Wachstum der Bakterien ist direkt proportional zu der Menge an ATP, die erzeugt werden kann, daher ist der von Bauchop und Elsdén (1960) eingeführte Koeffizient Y_{ATP} wichtig zur Charakterisierung des Wachstums. Die Bestimmung dieses Wertes ist nur möglich, wenn der ATP-Ertrag durch den Substratabbau genau bekannt ist, was nur bei anaerober Kultivierung möglich ist (Stouthamer und van Verseveld, 1986). Bei aeroben Studien muß entweder der P/O-Quotient bekannt sein, um die energetische Biomasseausbeute zu ermitteln oder umgekehrt. Für die Berechnung in dieser Arbeit wird der mechanistische Wert für die oxydative Phosphorylierung (P/O = 2) benutzt. Wie schon festgestellt, liegen die experimentell ermittelten P/O-Verhältnisse aber in der Regel unter diesem Wert, so daß die berechneten Daten nur als Richtwerte dienen sollten (Tempest und Neijssel, 1984).

Anfänglich wurde davon ausgegangen, daß Y_{ATP} eine definierte Größe für alle Organismen mit einem Wert von $10,5 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{mol}_{\text{ATP}}^{-1}$ ist (Bauchop und Elsdén, 1960). Inzwischen zeigten verschiedenen Studien, daß Y_{ATP} keine Konstante darstellt, sondern von mehreren Faktoren abhängt. So ermittelten Belaich et al. (1972) Werte von $4,7 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{mol}_{\text{ATP}}^{-1}$ für *Zymomonas mobilis* oder Stouthamer und Bettenhausen (1972) $30 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{mol}_{\text{ATP}}^{-1}$ für *Escherichia coli*. Die

gemessenen Werte in komplexen Medien lagen immer über denen in Minimalmedien (Stouthamer, 1977), was zeigt, daß die Mediumszusammensetzung einen Einfluß auf Y_{ATP} hat. Die verwendete Energie- und Kohlenstoffquelle spielt ebenfalls eine wesentliche Rolle (Stouthamer, 1973), insbesondere der Reduktionsgrad des Substrats. Einen geringen Einfluß auf den Koeffizienten hat die Zellzusammensetzung, es sei denn, es kommt zur Bildung einer großen Menge an Speicherstoffen, was eine Verringerung des ATP-Bedarfs zur Biomassebildung bewirkt (Stouthamer, 1977).

Die energiebezogene Zellausbeute ist abhängig von der Wachstumsrate, was zum einen mit der sich verändernden Zellzusammensetzung und zum anderen mit dem Auftreten der Erhaltungsenergie erklärt wird (Hempfling und Mainzer, 1975). Diese Erhaltungsenergie oder Maintenance-Bedarf wird benötigt für die Beibehaltung des pHs in der Zelle, die Aufrechterhaltung des osmotischen Drucks und des Protonengradienten und andere Prozesse, die der Stabilisierung der Zelle dienen. Die Zusammenhänge zwischen der spezifischen ATP-Bildungsrate q_{ATP} [$\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$], der Wachstumsrate μ [h^{-1}], dem Erhaltungskoeffizienten m_E [mol l^{-1}] und dem energiebezogenen Biomasseertragskoeffizienten Y_{ATP} [$\text{g}_{\text{BTM}} \text{mol}_{ATP}^{-1}$] faßte Pirt (1965) in folgender Gleichung zusammen:

$$q_{ATP} = \frac{\mu}{Y_{ATP}} = \frac{1}{Y_{ATP}^{\max}} + m_E \quad (2.16)$$

Die experimentell ermittelten Werte für Y_{ATP} liegen in der Regel deutlich unter denen der theoretisch errechneten, was nicht allein durch den Maintenance-Bedarf erklärt werden kann (Stouthamer und Bettenhausen, 1972). Unter gewissen Bedingungen kann eine Diskrepanz zwischen ATP-Produktion und ATP-Verbrauch entstehen, für die der Term "entkoppeltes Wachstum" von Senez (1962) eingeführt wurde. Die Entkopplung von Katabolismus und Anabolismus kann unter anderem in Minimalmedien auftreten (Stouthamer, 1977) oder wenn das limitierende Substrat gleichzeitig als Energie- und Kohlenstoff-Quelle genutzt wird (Neijssel und Tempest, 1975). Während des entkoppelten Wachstums kommt es zum Abbau von ATP, ohne daß die Zelle einen sichtbaren Nutzen davon hat. Zur Reduktion des ATP-Überschusses gibt es verschiedene Möglichkeiten: (i) ATP wird durch ATPase abgebaut (Stouthamer und van Verseveld, 1986), (ii) die Reduktion von NADH_2 ist nicht mit einer Phosphorylierung gekoppelt

(Anraku und Gennis, 1987), (iii) durch futile cycles (Stouthamer und van Verseveld, 1986) oder (iv) es werden energetisch ungünstigere Abbauewege wie z.B. der Methylglyoxalnebenweg gewählt (Neijssel und Tempest, 1975).

2.4.4 ATP-Bildungsrate Q_{ATP}

Die ATP-Bildungsrate ist hauptsächlich von der Sauerstoffaufnahme rate abhängig, da der größte Teil des ATPs in der Atmungskette entsteht. Weiteren Einfluß hat der Abbaueweg der Glucose, da je nach Stoffwechselweg verschiedene Mengen an Energie- und Reduktionsäquivalenten entstehen. Der Anteil der Reduktionsäquivalente, die in der Biomassessynthese reduziert oder oxidiert werden, ist sehr gering. Die Oxidation in der Atmungskette ist fest mit der Sauerstoffaufnahme rate gekoppelt, so daß der entstehende Fehler durch das Weglassen dieses Anteils sehr niedrig ausfällt (Schlieker, 1995).

Für die Berechnung der ATP-Bildungsrate gibt es verschiedene Ansätze (Stouthamer, 1973; Sukatsch und Dziengel, 1984; Korz, 1992), für die immer der P/O-Quotient bekannt sein muß. Da aber eine Bestimmung dieses Quotienten nur unter anaeroben Bedingungen möglich ist, wurde in dieser Arbeit der mechanistische Wert von $P/O = 2$ verwendet. Die meisten Ansätze unterscheiden nicht zwischen alternativ nutzbaren Stoffwechselwegen, sondern gehen davon aus, daß der Glucoseabbau ausschließlich über den Embden-Meyerhof-Parnas Weg erfolgt.

In dieser Arbeit wurde die Gleichung von Korz (1992) zur Berechnung genutzt, da in diesem Ansatz der Einfluß verschiedener Abbauewege der Glucose auf die ATP-Bildungsrate berücksichtigt wird. Der erste Teil der Gleichung beschreibt den Anteil des während des Katabolismus durch Substratkettenphosphorylierung gewonnenen ATPs, wohingegen der zweite Teil das durch Oxidation von Reduktionsäquivalenten gewonnene ATP in der Atmungskette darstellt.

$$Q_{ATP} = [Y_{ATP/S}^{Kat} \cdot Q_{Gluc} \cdot (1 - \frac{\alpha_C}{MW_{Gluc}} \cdot Y_{X/S})] + [2 \cdot Q_{O_2} \cdot (\beta_{NADH_2} \cdot Y_{ATP/NADH_2} + \sigma_{FADH_2} \cdot Y_{ATP/FADH_2} + \epsilon_{fpH_2} \cdot Y_{ATP/fpH_2})] \quad (2.17)$$

Im ersten Teil der Gleichung werden sowohl der substratbezogene Biomasseertragskoeffizient $Y_{X/S}$ [$g_{\text{BTM}} g_S^{-1}$] als auch der durch Substratkettenphosphorylierung erhalten ATP-Ertrag $Y_{\text{ATP}/S}^{\text{Kat}}$ [$\text{mol}_{\text{ATP}} \text{mol}_S^{-1}$], die Glucoseaufnahmerate Q_{Gluc} [$\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$] und der Anteil des Kohlenstoffs am Substrat berücksichtigt. Der zweite Teil umfaßt die Sauerstoffaufnahmerate Q_{O_2} [$\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$], sowie die einzelnen Anteile von NADH_2 , FADH_2 und fpH_2 an den im Katabolismus reduzierten Reduktionsäquivalenten β_{NADH_2} , σ_{FADH_2} , ϵ_{fpH_2} [$\text{mol mol}_{\text{Re}}^{-1}$] und die jeweiligen ATP-Ertragskoeffizienten $Y_{\text{ATP}/\text{Re}}$ [$\text{mol}_{\text{ATP}} \text{mol}^{-1}$]. Die Ertragskoeffizienten geben die Ausbeute des in der Atmungskette bei der Oxidation der Reduktionsäquivalente generierten ATPs an, wobei für *E. coli* mit einem $P/O = 2$ gilt: $Y_{\text{ATP}/\text{NADH}_2} = 2 \text{ mol}_{\text{ATP}} \text{mol}_{\text{NADH}_2}^{-1}$, $Y_{\text{ATP}/\text{FADH}_2} = 1 \text{ mol}_{\text{ATP}} \text{mol}_{\text{FADH}_2}^{-1}$ und $Y_{\text{ATP}/\text{fpH}_2} = 1 \text{ mol}_{\text{ATP}} \text{mol}_{\text{fpH}_2}^{-1}$.

Tabelle 2: Maximaler substratbezogener ATP-Ausbeutekoeffizient und Anteile der entstandenen Reduktionsäquivalente in Abhängigkeit von ihren Stoffwechselwegen; in Klammern sind die NADPH_2 angegeben, die im Pentosephosphat-Weg entstehen (EMP = Embden-Meyerhof-Parnas Weg; MGO = Methylglyoxal-Nebenweg; PP = Pentosephosphatweg; RE = Reduktionsäquivalente)

Koeffizienten	EMP	MGO	PP & EMP	PP & MGO
$Y_{\text{ATP}/S}^{\text{max}}$ [mol mol_S^{-1}]	26	20	25 2/3	20 2/3
$Y_{\text{ATP}/S}^{\text{Kat}}$ [mol mol_S^{-1}]	4	0	3 1/3	0
$\Sigma \text{ Re}$	12	12	12	12
NADH_2	10	8	8 1/3 (2)	6 2/3 (2)
FADH_2	2	2	1 2/3	1 2/3
fpH_2	0	2	0	1 2/3

In Tabelle 2 sind die Anteile der im Katabolismus entstandenen Reduktionsäquivalente und die maximal mögliche Ausbeute an ATP im Katabolismus und insgesamt aufgeführt. Die Koeffizienten wurden zum einen für den Abbau der Glucose über den Embden-Meyerhof-Parnas Weg (EMP) und zum anderen unter Berücksichtigung des Methylglyoxal-Nebenweges (MGO)

berechnet. Dabei wurde davon ausgegangen, daß der Abbau des Dihydroxyacetonphosphats entweder ausschließlich über den EMP-Weg oder ausschließlich über den MGO-Nebenweg erfolgte. Desweiteren wurde der Pentosephosphatweg (PP) unter der Annahme, daß er genau einmal durchlaufen wurde, einbezogen. Der entstandene C5-Körper wurde dann in Fructose-5-phosphat (2/3 Molekül pro Molekül Glucose) und Glycerinaldehydphosphat (1/3 Molekül pro Molekül Glucose) umgesetzt und durchläuft danach entweder ausschließlich den Embden-Meyerhof-Parnas Weg bzw. den Methylglyoxal-Nebenweg.

2.4.5 Adenosinnucleotid-Pool

Zur Beurteilung des Energiezustands der Zelle kann aus den Adenosinnucleotidkonzentrationen C_{ADP} [$\mu\text{mol l}^{-1}$] die Energieladung des Adenylatpools (adenylate energy charge = AEC) berechnet werden (Atkinson und Walton, 1967):

$$AEC = \frac{C_{\text{ATP}} + 0.5 \cdot C_{\text{ADP}}}{C_{\text{AMP}} + C_{\text{ADP}} + C_{\text{ATP}}} \quad (2.18)$$

Der AEC spielt in der Enzymregulation eine entscheidende Rolle. So zeigte Atkinson (1977), daß ATP-erzeugende Stoffwechselwege durch einen hohen AEC gehemmt, ATP-verbrauchende hingegen angeregt werden. Die Werte für die dimensionslose Größe AEC liegen zwischen 0 und 1, wobei bei $AEC = 1$ ausschließlich ATP vorliegt, während bei $AEC = 0$ nur AMP vorhanden ist. Inzwischen haben viele Studien sich mit sehr unterschiedlichen Ergebnissen mit der Bestimmung des AECs beschäftigt. So wurde in einigen Studien ein AEC von 0,5-0,9 für aktive *Escherichia coli* Zellen (Downs und Jones, 1975) postuliert, während andere Studien zeigten, daß Bakterien mit einem $AEC = 0,2$ noch geringe Stoffwechselaktivität aufwiesen (Barrette jr. et al., 1988).

Knowles (1977) stellte fest, daß die Zeit zum Abstoppen des Stoffwechsels im Verhältnis zu den Umsatzzeiten des Adenylatpools zu lang war, um eine genaue Ermittlung des AECs zuzulassen. Dieses Problem ist durch die vergleichsweise langsame Probenahme bedingt, welche in dieser Arbeit durch die Verwendung eines schnellen Probenahmemoduls verhindert wurde (Theobald et al., 1997).

2.5 Stoffflußmodellierung

Die Quantifizierung intrazellulärer Stoffflüsse ist ein wichtiger Aspekt der Untersuchung der Bakterienphysiologie. Eine gängige Methode stellt die Quantifizierung der intrazellulären Stoffflüsse durch die Bilanzierung einzelner Metabolite dar (Vallino und Stephanopoulos, 1990). Die Basis dafür liefert ein stöchiometrisches Model, das die Biochemie der Bakterien genau beschreibt. Die intrazellulären Flüsse werden aus den extrazellulären Metaboliten berechnet, indem für jedes eine Massenbilanz erstellt wird. Dabei wird von Pseudo-Fließgleichgewichten in der Zelle ausgegangen, so daß keine Enzymkinetiken bekannt sein müssen. Diese Pseudo-Fließgleichgewichte verlieren ihre Gültigkeit auch dann nicht, wenn die intrazellulären Metabolitkonzentrationen großen Schwankungen ausgesetzt sind, da diese Änderungen klein sind im Verhältnis zu den Flüssen durch den Pool (Vallino, 1991). Die Stoffflußanalyse ermöglicht (i) die Berechnung nicht gemessener extrazellulärer Flüsse (ii) die Berechnung der theoretischen maximalen Ertragskoeffizienten und (iii) die Identifikation von wichtigen Verzweigungen im Metabolismus und die Beurteilung der Flexibilität oder Starrheit dieser Verzweigungen (Jørgensen, 1995). Sind genügend Daten extrazellulärer Raten vorhanden, kann das Model der Überprüfung der Konsistenz einzelner Messungen dienen. Die Nachteile der Methode, die intrazellulären Stoffflüsse aus extrazellulären Messungen zu berechnen, sind unter anderem die Annahmen und Vereinfachungen, die betreffs der gesamten zellulären Aktivität gemacht werden müssen (Eggeling et al., 1995). Dazu gehört unter anderem die Zusammenfassung verschiedener Stoffwechselwege, so daß die Identifikation eines Engpasses innerhalb eines linearen Weges nicht möglich ist. Außerdem können parallel-verlaufende, alternative Stoffwechselwege - z.B. Embden-Meyerhof-Parnas Weg und Methylglyoxal-Nebenweg - nicht unterschieden werden, so lange keins der Intermediate dieser Wege exkretiert wird.

2.5.1 Flußberechnung

Die folgenden Gleichungen zur Berechnung der Stoffflüsse sind von Vallino und Stephanopoulos (1990) und Vallino (1991) eingeführt worden.

Die metabolische Flußverteilung erhält man aus der Anlehnung stöchiometrischer

Massenbilanzen an experimentell ermittelte Bildungs- und Verbrauchsdaten. Dabei beinhaltet jede Massenbilanz einen Akkumulationsterm, der die Summe aller produzierenden Prozesse minus der verbrauchenden Prozesse darstellt:

$$\sum_i \nu_{i,j} x_i - \sum_e \nu_{e,j} x_e = r_j \quad (2.18)$$

wobei \mathbf{x} die Flüsse in die Zelle (i) und aus der Zelle (e) darstellt, ν die stöchiometrischen Koeffizienten und r die Akkumulationsrate des Metabolits j. Die Massenbilanz jedes einzelnen Metabolits ergibt einen Satz Gleichungen, der durch folgende Matrixnotation ausgedrückt werden kann:

$$\mathbf{A} \mathbf{x} = \mathbf{r} \quad (2.19)$$

Hierfür werden die stöchiometrische ($\mathbf{m} \times \mathbf{n}$) Matrix \mathbf{A} , der ($\mathbf{n} \times 1$) Vektor \mathbf{x} für unbekannte Flüsse und der ($\mathbf{m} \times 1$) Vektor \mathbf{r} für die Akkumulationsrate eingeführt. Daraus ergibt sich, daß \mathbf{m} die Anzahl der beteiligten Metabolite darstellt und \mathbf{n} die Anzahl der Reaktionen. Da die Annahme getroffen wurde, daß sich das System in einem Pseudo-Fließgleichgewicht befindet, wird die intrazelluläre Metabolitakkumulation \mathbf{r} gleich Null gesetzt, während die extrazellulären Metabolite mit den gemessenen Raten gleichgesetzt werden. Aus dem Stoffwechselnetzwerk und den bekannten Metaboliten läßt sich jetzt ein Matrixsystem entwickeln, das mittels linearer Algebra gelöst werden kann (Vallino, 1991). Zur Demonstration soll ein simples Netzwerk mit drei Reaktionen dienen (Weber, 1997).



Nach Ermittlung der Massenbilanzen für A, B, C und D ergibt sich ein Satz an linearen Gleichungen:

$$-x_1 = r_A \quad (2.23)$$

$$-x_1 + x_3 = r_B \quad (2.24)$$

$$x_1 - x_2 = r_C \quad (2.25)$$

$$2x_2 - x_3 = r_D \quad (2.26)$$

Als Matrix notiert, ergeben sich die Dimensionen für \mathbf{A} mit 4×3 , für \mathbf{x} mit 3×1 und für \mathbf{r} mit 4×1 :

$$\begin{bmatrix} -1 & 0 & 0 \\ -1 & 0 & 1 \\ 1 & -1 & 0 \\ 0 & 2 & -1 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ x_3 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} r_A \\ r_B \\ r_C \\ r_D \end{bmatrix} \quad (2.27)$$

Um eine allein-gültige Lösung zu erhalten, ist es notwendig, daß die Anzahl der Gleichungen \mathbf{m} für die Massenbilanzen größer oder gleich der Anzahl der unbekannten Stoffflüsse \mathbf{n} ist ($\mathbf{m} \geq \mathbf{n}$). Das ist nur in dem Fall ausreichend, daß der Rang von \mathbf{A} , $R(\mathbf{A})$, der der Anzahl unabhängiger Reaktionen entspricht, äquivalent zu der Anzahl der unbekannten Stoffflüsse \mathbf{n} ist. Falls $R(\mathbf{A})$ niedriger als \mathbf{n} ist, bestehen Singularitäten, die eine allein-gültige Lösung nicht zulassen (Vallino, 1991).

Der Gleichungssatz kann mit der transponierten Matrix \mathbf{A}^T durch den algorithmischen Ansatz des kleinsten Quadrats gelöst werden:

$$\mathbf{x} = (\mathbf{A}^T \mathbf{A})^{-1} \mathbf{A}^T \mathbf{r} \quad (2.28)$$

2.5.2 Sensitivitätsanalyse

Falls \mathbf{A} nicht-singulär ist, kann zwar eine allein-gültige Lösung der Gleichung erfolgen, aber die erhaltenen Stoffflüsse können eine hohe Sensitivität auf Störungen der Messungen oder Fehler in dem angenommenen Stoffwechselnetzwerk aufweisen. Deshalb wurde die Konditionsnummer $C(\mathbf{A})$ als ein Maß für die Sensitivität der stöchiometrischen Matrix \mathbf{A} berechnet, die ein oberes Limit des relativen Fehlers der bestimmten Flüsse angibt.

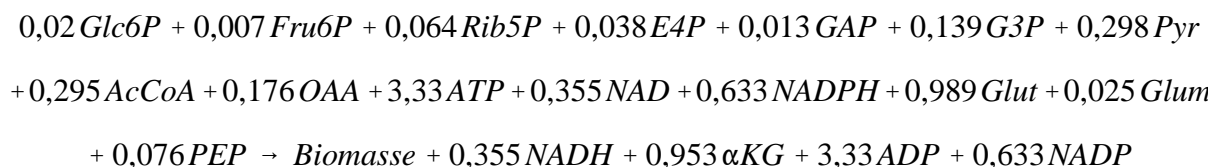
$$C(A) = \|A\| \|(A^T A)^{-1} A^T\| \quad (2.29)$$

$\|\cdot\|$ stellt eine beliebige Matrixform dar, wobei hier die Euklidische Norm benutzt wurde (Weber, 1997). Eine hohe Konditionsnummer über 1000 weist auf ein sehr sensitives Netzwerk hin, so daß das Modell durch Zusammenfassung verschiedener Reaktionen modifiziert werden muß. Ein $C(A)$ kleiner als 100 zeigt eine hohe Insensitivität auf Meßfehler, so daß das System als gut konditioniert gewertet werden kann (Vallino und Stephanopoulos, 1990).

2.5.3 Biomassebildung

Eine große Anzahl an Reaktionen dienen der Biomassebildung. Wenn auch der Fluß der einzelnen Reaktionen sehr niedrig ist, so kann die Summe der Reaktionen nicht ignoriert werden. Zur Vereinfachung werden die Reaktionen zu einer alles umfassenden Gleichung zusammengefaßt.

Um eine genaue Gleichung aufzustellen, ist die makromolekulare Zusammensetzung der Zelle wichtig. Nach Ingraham et al. (1983) besteht die Biotrockenmasse von *Escherichia coli* zu 58% aus Proteinen, 12% RNA, 13% Carbohydrat, 3,1% DNA, 3,4% Lipopolysaccharide, 2,5% Peptidoglycan, 2,5% Glycogen und 9,1% Lipiden. Die Biomasse wird aus 12 Monomeren unter Verbrauch von ATP, NADH und NADPH aufgebaut (Ingraham et al., 1983), so daß die Biomassebildungsgleichung berechnet werden kann. Dadurch entstand für *E. coli* folgende Gleichung für die Biomassebildung:



Die makromolekulare Zusammensetzung der Bakterien ist wachstumsabhängig (de Kwaadsteniet et al., 1976; Bremer und Dennis, 1987), so daß eigentlich für jede Rate eine neue Biomassegleichung aufgestellt werden müßte. Da die Veränderung der Zusammensetzung nur

einen sehr geringen Einfluß auf die Stoffflüsse hat (Weber, 1997), wurden die Stoffflüsse jedoch immer mit der selben Zusammensetzung berechnet.

2.5.4 Vereinfachung des Stoffwechselnetzwerks

Die Komplexität des Bakterienstoffwechsels kann durch Zusammenfassung einzelner Reaktionen stark vereinfacht werden. Außerdem können Reaktionen, die nur unter bestimmten Bedingungen aktiv sind, aus dem Netzwerk gestrichen werden. So wurde z.B. für die anaplerotischen Reaktionen des Tricarbonsäurezyklus nur die PEP-carboxylase Reaktion berücksichtigt, da bei Wachstum auf Glucose keine Aktivität der Malatdehydrogenase-decarboxylase oder des Glyoxalat-Bypass zu finden ist (Holms, 1986).

Durch die Aktivität der Transdehydrogenase, die bei *Escherichia coli* nachgewiesen wurde (Hu et al., 1995), ergibt sich eine Singularität, die eine allein-gültige Lösung der Matrix nicht zuläßt. Da die sehr geringe Aktivität des Enzyms keinen signifikanten Einfluß auf die Stoffflüsse hat, wurde die Transhydrogenase-Reaktion bei der Berechnung nicht berücksichtigt.

Mit Hilfe dieser Vereinfachungen wurde ein überschaubares Stoffwechselnetzwerk erstellt, mit dem die Stoffflüsse berechnet werden konnten.

2.6 Proteinproduktion mittels rekombinanter *Escherichia coli*

Die Zellphysiologie rekombinanter *E. coli* wird während der Produktion eines zellfremden Proteins durch die für die Produktion notwendigen Kultivierungsparameter sowie durch die zur Synthese erforderlichen Stoffwechselleistungen stark beeinflusst. So kann die Synthese plasmidcodierter, heterologer Proteine zu starken Veränderungen im Katabolismus führen (George et al., 1992), sowie eine hitzeschockartige Reaktion hervorrufen und die Synthese von sogenannten Hitzeschockproteinen wie z.B. DnaK verstärken (Rinas, 1996). Außerdem kann eine Inhibierung des Zellwachstums, die Zerstörung der Ribosomen und letztendlich das Absterben der Wirtszelle die Folge der Proteinproduktion sein (Kurland und Dong, 1996).

2.6.1 Basischer Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF)

Das in vielen Körperorganen und -sekreten nachweisbare Protein bFGF gehört zu der Familie der heparinbindenden Wachstumsfaktoren, die an der Kontrolle der Zellteilung und Differenzierung beteiligt sind (Gospodarowicz et al., 1987). Es wirkt unter anderem stimulierend auf die Zellteilung von Endothelzellen, so daß bFGF zur Beschleunigung der Wundheilung bei schlecht heilenden oder chronischen Wunden eingesetzt werden kann (Meyer-Ingold, 1993). Ein weiteres Einsatzgebiet für bFGF stellt die Zellkulturtechnik dar, weil die zellproliferierende Wirkung das Zellwachstum stimuliert (Renner et al., 1995).

BFGF ist ein monomeres, unglykosyliertes Protein mit einer Kettenlänge von 155 Aminosäuren (Abraham et al., 1986). Das globuläre Protein setzt sich aus drei Submotiven mit vier antiparallelen β -Faltblattsträngen zusammen. Das Protein weist weder α -helicale Strukturen auf noch Disulfidbrücken, obwohl Cysteine vorhanden sind (Eriksson et al., 1993).

Die Konformationsstabilität unter physiologischen Bedingungen ist bei bFGF im Vergleich zu anderen globulären Proteinen sehr niedrig (Etapé et al., im Druck).

2.6.2 Inclusion Bodies

Die Produktion heterologer Proteine in Bakterien führt häufig zur Bildung von zellulären Einschlußkörpern an den Polen der Zelle, die von keiner Membran umgeben sind (Mitraki und King, 1989). Die Bildung dieser erstmals bei der Insulinsynthese beobachteten Inclusion Bodies (Williams et al., 1982) ist sowohl von den Kultivierungsparametern als auch von den Eigenschaften des Proteins abhängig (Rinas, 1997). Die rekombinanten Proteine sind Bestandteile dieser Inclusion Bodies, liegen aber in einer biologisch inaktiven Form vor, was eine Überführung in eine lösliche Form durch Solubilisierung mit chaotropen Reagenzien notwendig macht.

Durch die temperaturinduzierte Synthese von bFGF entstehen neben löslichem Protein auch Inclusion Bodies. Die Bildung der Inclusion Bodies ist darauf zurückzuführen, daß die Diffusion der Proteinketten sehr langsam erfolgt, so daß am Syntheseort eine hohe Konzentration an sich faltenden bFGF-Molekülen zu finden ist. In Abwesenheit von stabilisierenden Reagenzien führt

bei pH 7 und Raumtemperatur schon eine Konzentration von 100 mg l^{-1} zur Aggregation, so daß Inclusion Bodies entstehen (Rinas, 1997). Bei der bFGF-Produktion kam es nicht zu der häufig beobachteten starken morphologischen Veränderung des Wirtsorganismus (Kurland und Dong, 1996), sondern nur zu einer leichten Elongation der Zelle (Rinas, 1997).

3. Material und Methoden

3.1 Mikroorganismus

Die Versuche wurden mit dem apathogenen *Escherichia coli* K12 Stamm TG1 durchgeführt. Der Stamm wird bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, unter der Bezeichnung DSM 6056 geführt. Der Genotyp dieses Organismus ist: supE_hsd⁺5⁺thi⁺(lac-proAB)F'[traD36proAB⁺lacI^qlacZ M15]. *E. coli* TG1 kann gut auf synthetischen Medien wachsen, weist allerdings eine Thiamin Auxotrophie auf, die das Zufüttern dieses Vitamins notwendig macht.

Für die Hochzelldichtekultivierung wurde ein rekombinanter *Escherichia coli* TG1 genutzt, der den humanen, basischen Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF) produziert. Als Vektor trägt der Wirtsorganismus den Plasmid pλFGFB, welches als Marker ein Ampicillinresistenzgen enthält. Unter Kontrolle des thermisch induzierbaren λPRPL-Promoters wurde die Gensequenz des bFGF kodiert (Seeger, 1995).

3.1.1 Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgte in einer Glycerinkultur (50 v/v %) bei -70°C, wobei die Stammkulturen in regelmäßigen Abständen (halbjährlich) erneuert werden mußten.

Die aufgetauten Glycerinkulturen wurden auf LB-Agarplatten (10 g l⁻¹ Casein-Pepton; 10 g l⁻¹ NaCl; 5 g l⁻¹ Hefeextrakt; 2% Agar; pH = 7,0) ausgestrichen und bei 30°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde eine Vorkultur mit LB-Medium und danach eine mit dem später verwendeten Medium (s. 3.2) für jeweils 8-12 h bei 30°C inkubiert. Die zweite Vorkultur diente als Inokulum für die Kultivierung im Bioreaktor.

3.2 Medium

Die Kultivierungen wurden mit einem Minimalmedium durchgeführt, welches das Erreichen einer hohen Zelldichte ermöglicht (Riesenberg et al., 1990; Hellmuth, 1993). Für die kontinuierlichen Kultivierungen wurde ein leicht modifiziertes Medium verwendet, da die unterschiedliche Kultivierungsstrategie andere Ansprüche an das Medium stellt.

Tabelle 3: Inhaltsstoffe der verwendeten Medien für die kontinuierliche (Chemostat) und die Hochzelldichte- Kultivierung (HDF)

Substanz	Endkonzentration [g·l ⁻¹]		
	Chemostat	HDF	Fütterung
(NH ₄) ₂ SO ₄	8	---	8
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,8	4	---
KH ₂ PO ₄	2,7	13,3	---
Glucose*6H ₂ O	11	30	875
MgSO ₄	1	1,2	20
Eisen(III)citrat*H ₂ O	12 · 10 ⁻³	0,1	40 · 10 ⁻³
Citronensäurehydrat	0,35	1,7	---
CoCl ₂ *6H ₂ O	0,5 · 10 ⁻³	2,5 · 10 ⁻³	4 · 10 ⁻³
MnCl ₂ *4H ₂ O	3 · 10 ⁻³	15 · 10 ⁻³	23,5 · 10 ⁻³
CuCl ₂ *2H ₂ O	0,3 · 10 ⁻³	1,5 · 10 ⁻³	2,3 · 10 ⁻³
H ₃ BO ₃	0,6 · 10 ⁻³	3 · 10 ⁻³	4,7 · 10 ⁻³
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,5 · 10 ⁻³	2,1 · 10 ⁻³	4 · 10 ⁻³
Zn(CH ₃ COO)*2H ₂ O	1,6 · 10 ⁻³	33,8 · 10 ⁻³	16 · 10 ⁻³
EDTA	1,7 · 10 ⁻³	14,1 · 10 ⁻³	13 · 10 ⁻³
Thiamin	4 · 10 ⁻³	4,5 · 10 ⁻³	4,5 · 10 ⁻³
Ampicillin	---	50 · 10 ⁻³	50 · 10 ⁻³

Zur Vermeidung einer Maillard-Reaktion wurden Glucose und Magnesiumsulfat getrennt von dem Phosphatpuffer mit den Spurensalzen autoklaviert. Der pH wurde vor dem Sterilisieren mit $1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaOH}$ auf $\text{pH} = 6,6$ eingestellt. Thiamin und Ampicillin wurden wegen ihrer Hitzeinstabilität sterilfiltriert.

3.3 Kontinuierliche Kultivierung

3.3.1 Bioreaktor

Die kontinuierliche Kultivierung wurde in einem 2l-Glasbioreaktor Modell SGI 7F-Set2 (Firma Setric) durchgeführt. Die Durchmischung erfolgte mit einem 4-Blatt-Scheibenrührer, wobei die Rührwelle von einem Gleichstrommotor angetrieben wurde ($N_{\text{max}} = 1000 \text{ U min}^{-1}$). Zur Regelung dienten eine Temperaturregeleinheit mit integriertem Heizstab, eine pO_2 -Einheit und eine pH-Regelungseinheit (Fa. Meredos). Die Begasung mit Luft erfolgte über einen Ringbegaser am Boden des Bioreaktors.

3.3.2 Versuchsaufbau und Versuchsführung

Der Versuchsaufbau der kontinuierlichen Prozeßführung ist in Abbildung 3 zu sehen. Das vorgelegte Medium wurde mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (Microperpex peristaltic pump, Fa. LKB Bromma), durch welche die Flußrate eingestellt wurde, in den Fermenter transportiert. Das Vorlagegefäß befand sich auf einer Waage (Model AEW 5205F, Fa. Altenrath), um die eingestellten Durchflußraten ermitteln zu können (Gleichung 2.3). Durch das ständige Absaugen überschüssiger Kulturbrühe wurde das Volumen im Bioreaktor konstant gehalten.

Die kontinuierliche Kultivierung von *Escherichia coli* TG1 wurde bei 28°C in dem modifizierten HDF-Medium bei $\text{pH} = 6,6$ durchgeführt, wobei die pH-Korrektur während der gesamten Kultivierung automatisch mit $2,5 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaOH}$ erfolgte. Um ein ausreichendes Sauerstoffangebot für die Bakterien zu gewährleisten, wurde mit einer Begasungsrate von $115,53 \text{ l h}^{-1}$ mit technischer Luft (20,94 % Sauerstoff; 0,03 % Kohlendioxid; Rest Stickstoff) begast und die Kultur mit einer Rührgeschwindigkeit von 800 U min^{-1} durchmischt.

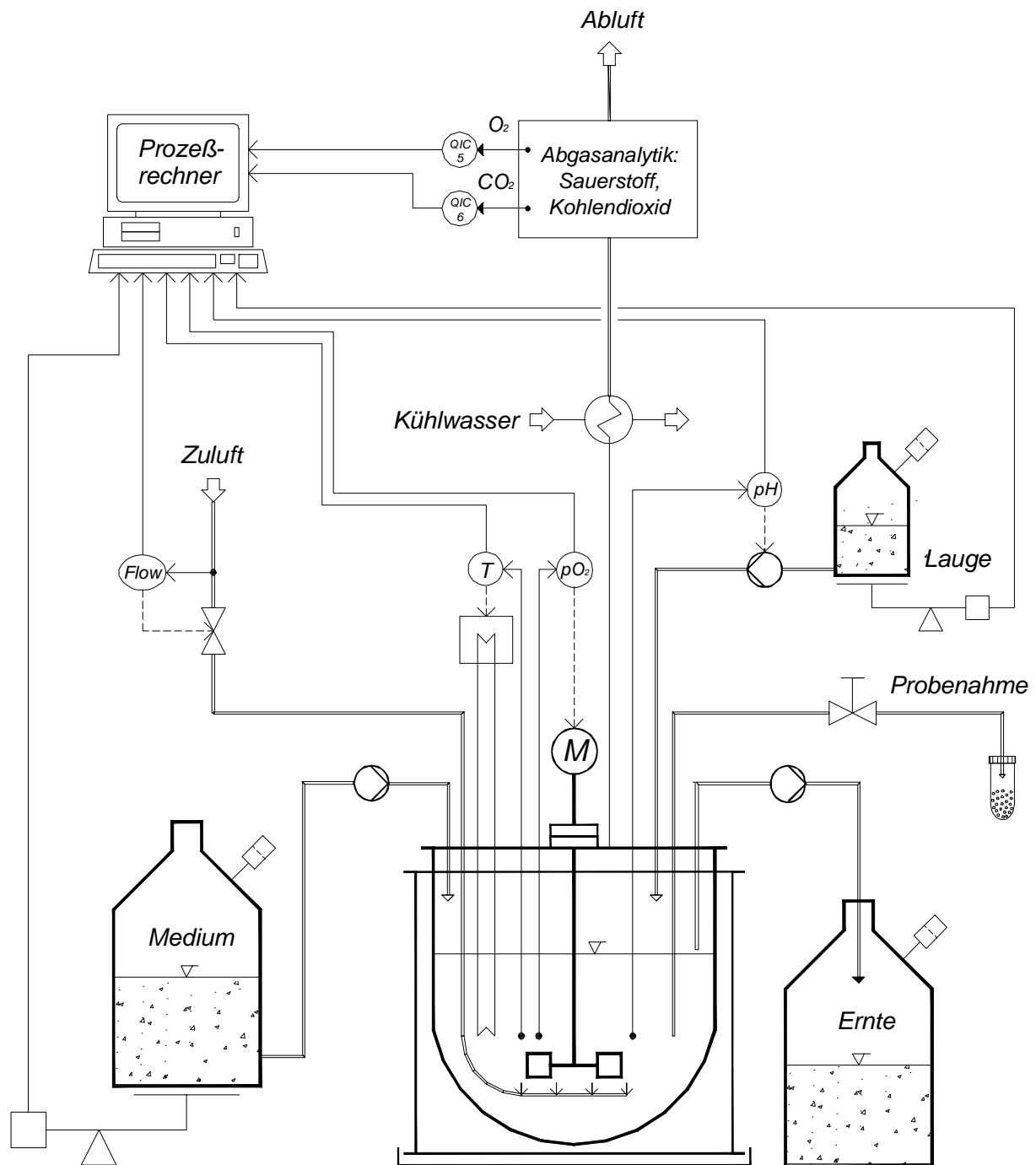


Abbildung 3: Schema des Versuchsaufbaus für die kontinuierliche Kultivierung

3.3.3 On-line Analytik

Der aktuelle pH-Wert wurde während des gesamten Prozesses kontinuierlich durch eine hitzesterilisierbare Einstabmeßkette (Fa. Ingold) bestimmt und während der laufenden Versuche zusätzlich extern überprüft. Die Ermittlung des Gelöst-Sauerstoffes (pO_2) wurde mit einer hitzesterilisierbaren pO_2 -Elektrode (Fa. Ingold) durchgeführt. Zur Bestimmung der Abgaszusammensetzung war ein Abgasanalysegerät (Oxygor 6N und Unor 6N der Fa. Maihak) an den Bioreaktor angeschlossen, das einmal pro Woche mit einem Gas bekannter Zusammensetzung überprüft wurde. Die on-line gemessenen Werte (pH-Wert, pO_2 und Abgasanalytik) wurden ebenso wie Temperatur und Rührgeschwindigkeit von einem Schreiber (Model 3081 Hybrid recorder, Fa. Yokogawa Hokoshin Electric) mitgeschrieben und zusätzlich durch ein angeschlossenes Prozeßleitsystem (Ubicon) aufgezeichnet.

3.4 Hochzelldichtekultivierung

3.4.1 Bioreaktor

Die Hochzelldichtekultivierung erfolgte in einem 50 l Edelstahlbioreaktor mit einem wasserdurchströmten Doppelmantel, der an ein Wärmeaustauschsystem angeschlossen war. Die Begasung erfolgte mit technischer Luft und bei Bedarf zusätzlich mit reinem Sauerstoff, wobei die Dosierung durch einen Mass-Flow-Controller (Fa. Brooks, Niederlande) kontrolliert wurde. Für die Durchmischung sorgte ein Scheibenrührer, dessen Drehgeschwindigkeit bei sinkender Sauerstoffsättigung des Mediums erhöht wurde. Die Prozeßparameter pO_2 , pH und Temperatur wurden von radial eingeführten Sensoren gemessen. Die Prozeßüberwachung gewährleistete das Prozeßleitsystem Yokogawa μXL , welches die externen Geräte - Zufütterungs-, Laugen- und Antischaumventil - ansteuerte.

3.4.2 Versuchsführung

Der Produktion von bFGF in der Hochzelldichtekultivierung wurde das zweiphasige Verfahren von Seeger (1995; Seeger et al., 1995) zu Grunde gelegt, mit der Zelldichten von ca. 65 Gramm Biotrockenmasse erreicht werden können. Zu Beginn des Prozesses erfolgt die satzweise Kultivierung der Bakterien, in der unlimitedes Wachstum möglich ist (Satzkultivierung). Bei Erreichen der stationären Phase aufgrund der eintretenden Kohlenstofflimitierung beginnt das gesteuerte, exponentielle Zufüttern frischen Mediums (Fed-Batch I). Anschließend erfolgt durch einen Temperatursprung die Induktion, welche die Fed-Batch Phase II einleitet, in der die Produktbildung stattfindet.

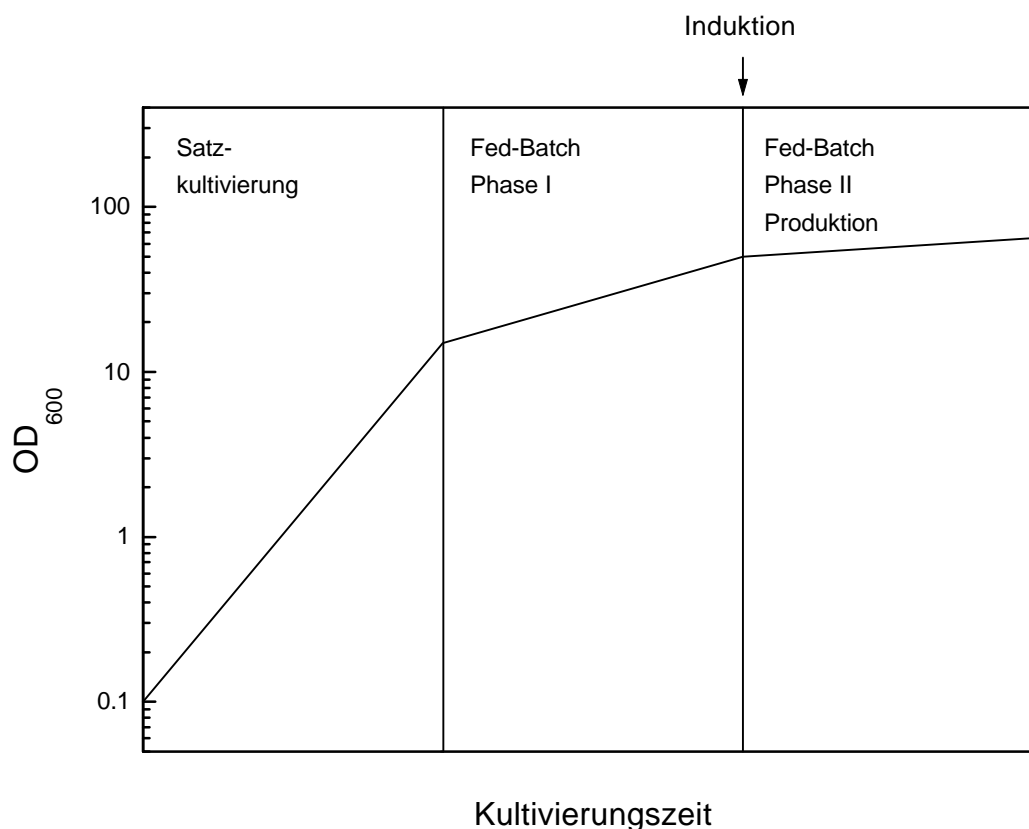


Figure 4: Schematische Darstellung einer Hochzelldichtekultivierung nach dem Verfahren von Seeger (1995; Seeger et al., 1995)

Die Zufütterungsrate während der Fed-Batch Phasen I und II wird so bemessen, daß ein Wachstum mit einer festgelegten, spezifischen Wachstumsrate erfolgen kann. Die Zufütterungsrate wird dabei unter der Annahme, daß das limitierende Substrat - Kohlenstoff - ausschließlich zur Biomasse- und Kohlendioxidbildung genutzt wird, mit folgender Gleichung berechnet:

$$m_S(t) = \left(\frac{\mu_{set}}{Y_{X/S}} + m \right) \cdot X_F \cdot V_F \cdot e^{\mu_{set} \cdot (t - t_F)} \quad (3.1)$$

Hierbei ist $m_S(t)$ [g h⁻¹] der einzustellende Massenstrom, um die gewünschte Wachstumsrate μ_{set} [h⁻¹] zu erhalten. V_F stellt das Volumen zu Beginn der Kultivierung (25 l) dar, $Y_{X/S}$ den auf die Kohlenstoffquelle bezogenen Ausbeutekoeffizienten [g_{BTM} g_S⁻¹], unter der Annahme, er bleibt konstant bei $Y_{X/S} = 0,5$ g_{BTM} g_S⁻¹. Von dem Erhaltungskoeffizienten m wurde angenommen, daß er unverändert bei $m = 0,025$ g_S g_{BTM}⁻¹ h⁻¹ bleibt (Korz et al., 1995; Seeger et al., 1995).

Die Satzkultivierung und die Fed-Batch Phase I finden bei 30°C statt, so daß keine Produktbildung stattfindet. Die Zufütterungsrate wurde so eingestellt, daß eine Wachstumsrate von $\mu_{set} = 0,12$ h⁻¹ in der ersten Fed-Batch Phase erreicht wurde. Die zweite Fed-Batch Phase wurde durch Erhöhen der Temperatur bei einer Zelldichte von 50 g l⁻¹ eingeleitet. In dieser Phase, in der die Kultivierung bei 42°C durchgeführt wurde, erfolgte durch die Hitzeinduktion die Produktion des Fremdproteins bFGF.

Nach der Temperaturinduktion wurde der Massenstrom reduziert, so daß die spezifische Wachstumsrate auf $\mu_{set} = 0,08$ h⁻¹ herabgesetzt wurde (Seeger et al., 1995). Die Reduktion der Zufütterungsrate ist notwendig, um eine zu hohe Essigsäurebildung zu vermeiden (Seeger et al., 1995), da Essigsäure sowohl das Wachstum hemmt als auch die Produktionsrate rekombinanter Proteine senkt (Bech-Jensen und Carlsen, 1990).

3.5 Analytische Methoden

3.5.1 Probenahme

Während der kontinuierlichen Kultivierung dauert es einige Zeit, bevor sich nach Veränderung der Durchflußrate wieder ein Fließgleichgewicht einstellt, daher wurden mindestens fünf Verweilzeiten abgewartet, bevor die erste Probenahme erfolgte.

Bei der Probenahme bildete das Abstoppen des Stoffwechsels das größte Problem, da die Reaktionen in der Zelle sehr schnell ablaufen und somit während der Probenahme große Fehler entstehen können. Dieses ist gerade bei der Bestimmung der Konzentrationen intrazellulärer Metabolite problematisch, da sich die Reaktionen in der Zelle in Sekundenbruchteilen abspielen. Die Probenahme erfolgte deswegen mit Hilfe eines schnellen Probenahmemoduls in evakuierte, vorgekühlte, mit eisgekühlten Glaskugeln (-20°C) gefüllte Glasprobengefäße, so daß die Temperatur der Proben schnell durch den Kontakt mit dem kalten Glas herabsank (Theobald et al., 1997). Für die Extraktion der Zelle wurde das Extraktionsmittel in den Probengefäßen vorgelegt.

Die Notwendigkeit dieser Maßnahmen wurde in einem Experiment zur Stabilität des AECs deutlich (Abb. 5). Obwohl alle Proben sofort auf 4°C herabgekühlt wurden - ohne sofortige Extraktion -, kam es zu einem Zerfalls des ATPs zu AMP. Je höher die Wachstumsrate war, desto schneller nahm die ATP-Konzentration und damit auch der AEC ab. Bei schnellem Wachstum war der Stoffwechsel der Bakterien besonders aktiv, so daß es zu schnelleren Stoffumsetzungen kam. Nach zwei Tagen war der Wert bei allen Proben auf ein Viertel des Ausgangswerts gesunken, selbst bei Aufbewahrung der Proben bei -70°C.

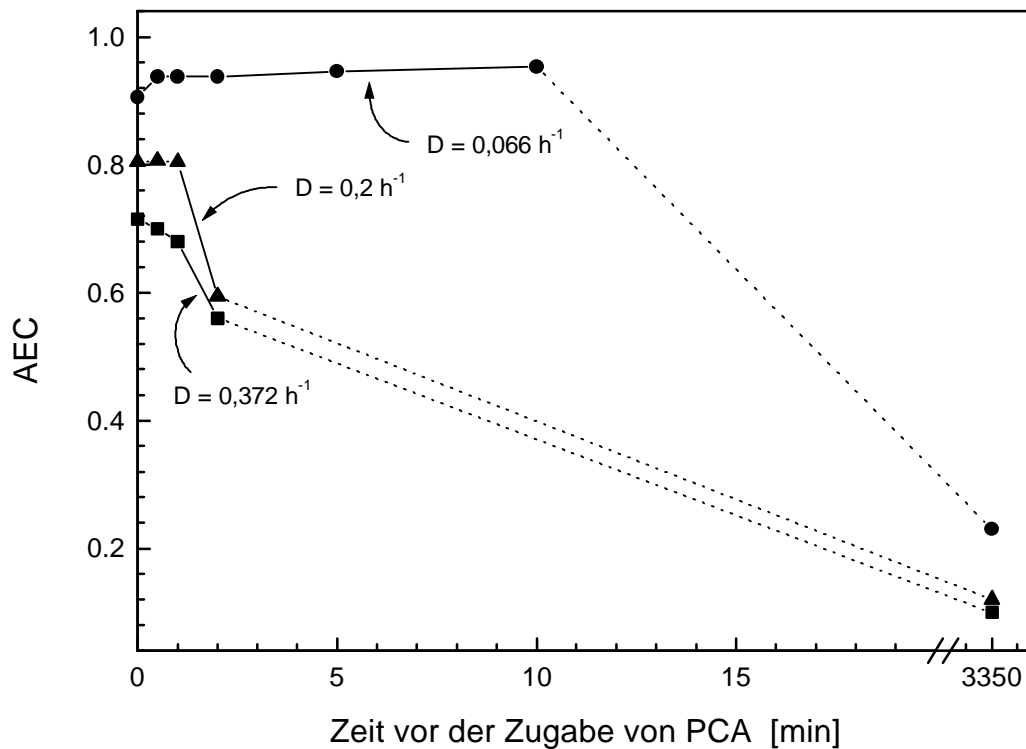


Figure 5: AEC bei *Escherichia coli* TG1 über der Zeit vor der Zugabe des Extraktionsmittels. Die Probenahme erfolgte mit dem schnellen Probennahmemodul und die Proben wurden direkt in einem Eis-Kochsalzgemisch (-20°C) gekühlt

3.5.2 Bestimmung der Zellkonzentration

3.5.2.1 Optische Dichte

Die Trübung einer Kultur nimmt proportional zur Bakterienmasse zu, daher ist die Trübungsmessung als indirekte Methode geeignet, die Zellkonzentration zu bestimmen. Die Trübung ließ sich mit einem Spectralphotometer (Novaspec II, Fa. Pharmacia) bei $\lambda = 600 \text{ nm}$ messen, wobei die Proben so verdünnt wurden, daß die Extinktion zwischen 0,1 und 0,5 lag.

3.5.2.2 Biotrockenmasse

Eine weitere direkte Methode die Zellkonzentration festzustellen, ist die Bestimmung der Biotrockenmasse. Zur Ermittlung der Trockenmasse wurden 2 ml (kontinuierliche Kultivierung) bzw. 1 ml (Hochzelldichtekultivierung) Bakteriensuspension in vorgetrockneten, abgewogenen Kunststoffcaps zentrifugiert (30 min bei 5000 g; Zentrifuge Omnifuge 2.0 RS, Fa. Heraeus) und die Pellets nach zweimaligem Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung im Vakuumtrockenschrank KVTs 11 (Fa. Salvis) bis zur Gewichtskonstanz getrocknet (ca. 48 h bei 40°C).

3.5.2.3 Zählkammer

Die Zellkonzentration wurde während der kontinuierlichen Kultivierung zusätzlich durch direktes Auszählen der Zellen unter dem Mikroskop ermittelt. Die Zellen wurden in einer Zählkammer nach Thoma (Tiefe von 0,02 mm; Fläche des Kleinquadrates von 1/400 mm²) gezählt, wobei die Konzentration der Organismen nicht zu hoch sein durfte, d.h. die Proben mußten vor dem Zählen entsprechend verdünnt werden. Daraus ergab sich für die Berechnung der Bakterienkonzentration [ml⁻¹]:

$$\text{Zellkonzentration} = \text{Anzahl Zellen je Kleinquadrat} \cdot \text{Verdünnung} \cdot 2 \cdot 10^7 \quad (3.2)$$

Um die Abhängigkeiten und die Genauigkeit der Bestimmungsmethoden zu untersuchen, fanden bei mehreren Satzkultivierungen alle drei Methoden Anwendung (Abb. 6). Da *Escherichia coli* zu den Standardzellen zählt (Schlegel, 1984), ist die Zunahme der Zellzahl und der Zellmasse erwartungsgemäß proportional zueinander gewesen. Bei niedrigen Bakterienkonzentrationen war die Bestimmung der Trockenmasse nur mit sehr großen Meßfehlern möglich, obwohl diese Methode ansonsten die geringsten Abweichungen aufwies. So kam es bei der Zellzählung zu Schwankungen um 15-20 %, während die optische Dichte nur 10-15 % Abweichungen zeigte. Bei der Trockenmassebestimmung konnte die Abweichung vom Mittelwert nach gründlichem Waschen mit Saline unter 10 % gesenkt werden. Die Meßfehler der ersten beiden Methoden lassen sich durch die notwendigen Verdünnungen (1:100) erklären, während bei der Trocknung

die Salze, die nicht ausgewaschen werden konnten, zu Fehlern führten.

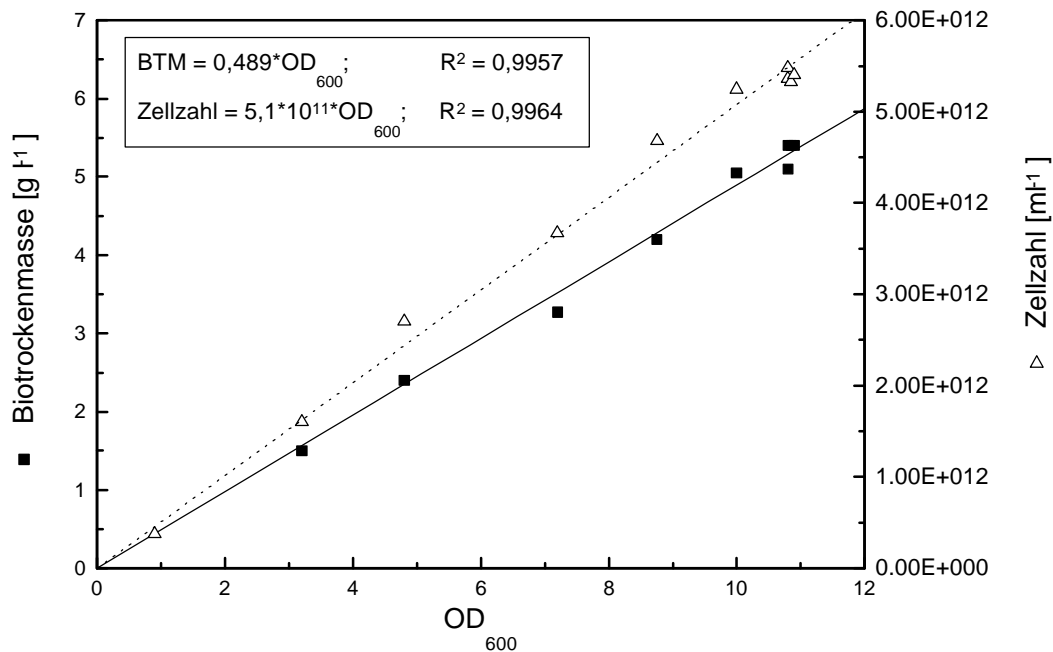


Figure 6: Abhängigkeit der unterschiedlichen Biomassebestimmungsarten bei *E. coli* TG1 während einer Satzkultivierung

Da im Chemostaten die Zellmasse konstant gehalten wurde, dienten später nur die optische Dichte als schnelle Bestimmungsmethode zur Überwachung des Prozesses und die Biotrockenmasse zur genauen Ermittlung der Konzentration. Bei einigen dynamischen Versuchen wurden noch einmal die Zellzahl und auch die Zellgröße der Bakterien verglichen, aber es waren keine Veränderungen zu erkennen.

3.5.3 Elementaranalyse

Die bei der kontinuierlichen Kultivierung erhaltene Biotrockenmasse wurde auf den Kohlenstoff-, Stickstoff-, Wasserstoff- und Sauerstoffgehalt untersucht. Die Trockensubstanz (1,5 bis 2,5 mg) wurde im Elementaranalysator PE 2400 II (Fa. Perkin Elmar) oxidiert und dann in Form von

niedermolekularen Verbindungen in die Gasphase gebracht. Aufgrund der unterschiedlichen Wärmeleitfähigkeiten der Gase konnten die Konzentrationen der Stoffe ermittelt werden.

3.5.4 Ammoniumbestimmung

Die Ammoniumkonzentration im Kulturüberstand wurde mit der gassensitiven Ammonium-Elektrode Modell Orion 95-12 der Fa. Colora bestimmt. Nach dem Nernst'schen Gesetz:

$$C_{Probe} = C_{Standard} \cdot 10^{\frac{U_{Standard} - U_{Probe}}{b}} \quad (3.3)$$

lassen sich mit Hilfe des Faktors b , der aus einer Kalibriergeraden mit bekannten Ammoniaklösungen ermittelt wurde, und aus den gemessenen Spannungswerten U [V] die Konzentrationen C [mol l⁻¹] errechnen.

3.5.5 Organische Säuren und Glucose

Die organischen Säuren und Glucose wurden mit einer chromatographischen Methode (HPLC; Fa. Techlab) quantifiziert. Die filtrierten Proben wurden auf eine Anionenaustauschersäule (Animex HPX-87H; Fa. Biorad) bei 25°C aufgebracht und mit 5 mmol l⁻¹ Schwefelsäure eluiert. Die Retentionszeiten der organischen Säuren wurden mit einem UV-Detektor (SPD 6A, Fa. Shimadzu) und die der Glucose durch den Brechungsindex Detektor (Sophex RI-71) ermittelt. Aufgrund der verschiedenen Retentionszeiten konnten Essigsäure, Lactat, Pyruvat, α-Ketoglutarat, Citrat und Glucose getrennt und anhand der Peakflächen quantitativ bestimmt werden.

Der Glucosegehalt wurde zusätzlich mit dem Glucoseanalysator Modell 2000 (Fa. Yellow Springs) gemessen. Die Messung mit dem Glucoseanalysator beruhte auf der enzymatischen Umsetzung der Glucose mit membrangebundener Glucose-Oxidase, bei der eine Freisetzung von Wasserstoffperoxid erfolgt, welches von einer nachgeschalteten Elektrode gemessen wurde.

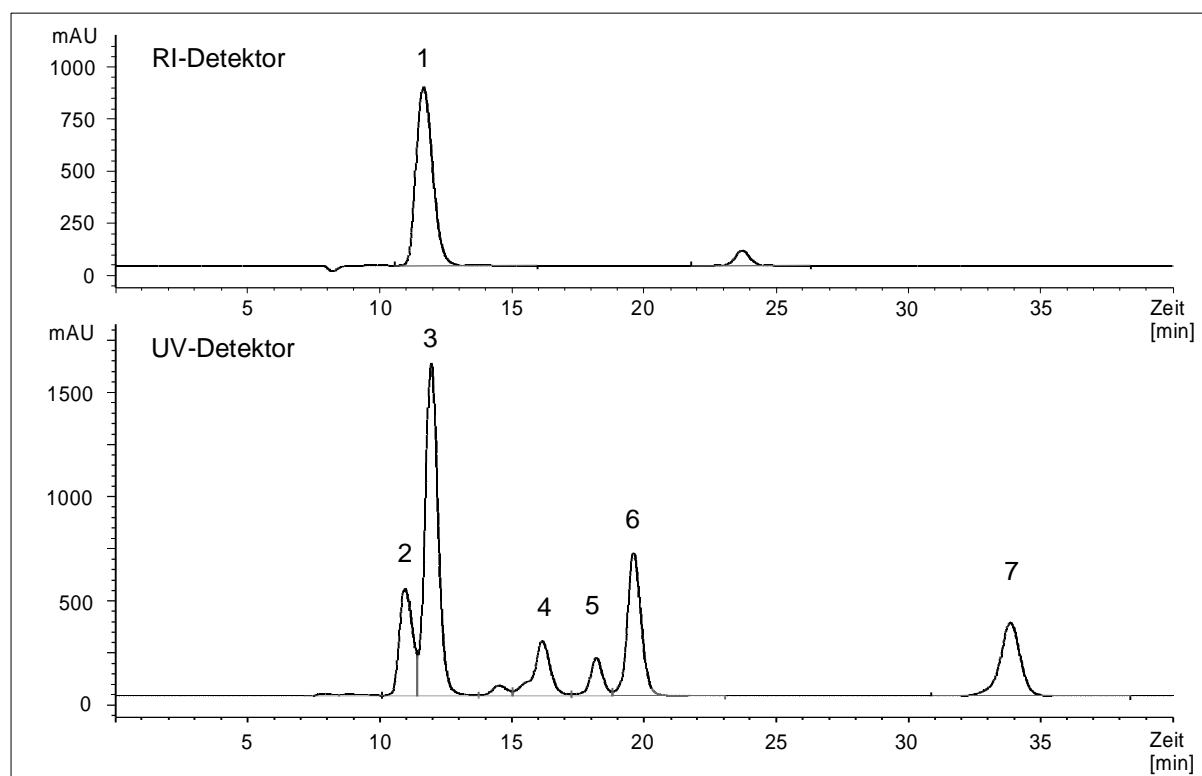


Figure 7: HPLC-Chromatogramme des RI- und UV-Detektors bei der Trennung von organischen Säuren und Zuckern auf einer Anionenaustauschersäule mit 5 mmol l⁻¹ H₂SO₄ bei 25°C; 1 = Glucose (10 g l⁻¹); 2 = Zitronensäure (1 g l⁻¹); 3 = Pyruvat (2 g l⁻¹); 4 = Lactat (2 g l⁻¹); 5 = Formiat (1 g l⁻¹); 6 = Essigsäure (2 g l⁻¹); 7 = Uracil (0,08 g l⁻¹)

3.5.6 Extraktion und quantitative Bestimmung intrazellulärer Nucleotide

Für die Bestimmung der intrazellulären Nucleotidkonzentrationen wurde eine saure Extraktion der Zellen durchgeführt. Die Probenahme erfolgte wie oben beschrieben (siehe 3.5.1) und es wurde zusätzlich kalte Perchlorsäure (PCA) zur sofortigen Extraktion in den Probengefäßen vorgelegt. Nach drei Minuten im Eisbad wurden die Proben mit KOH neutralisiert und nach weiteren 3 min im Eisbad zentrifugiert (10 min, 4000 U bei 4°C in der Kühlzentrifuge Heraeus Sepatech). Der Überstand wurde sofort in der HPLC (HP 1090, Fa. Hewlett Packard) nach der Methode von Ryll und Wagner (1991) auf eine Reversed Phase Säule (Supelcosil LC-18; Fa. Supelco) bei einer Temperatur von 22°C aufgebracht und die Konzentrationen der

Adenosinnucleotide ATP, ADP, AMP und cAMP bestimmt und daraus der Energiegehalt der Zelle berechnet.

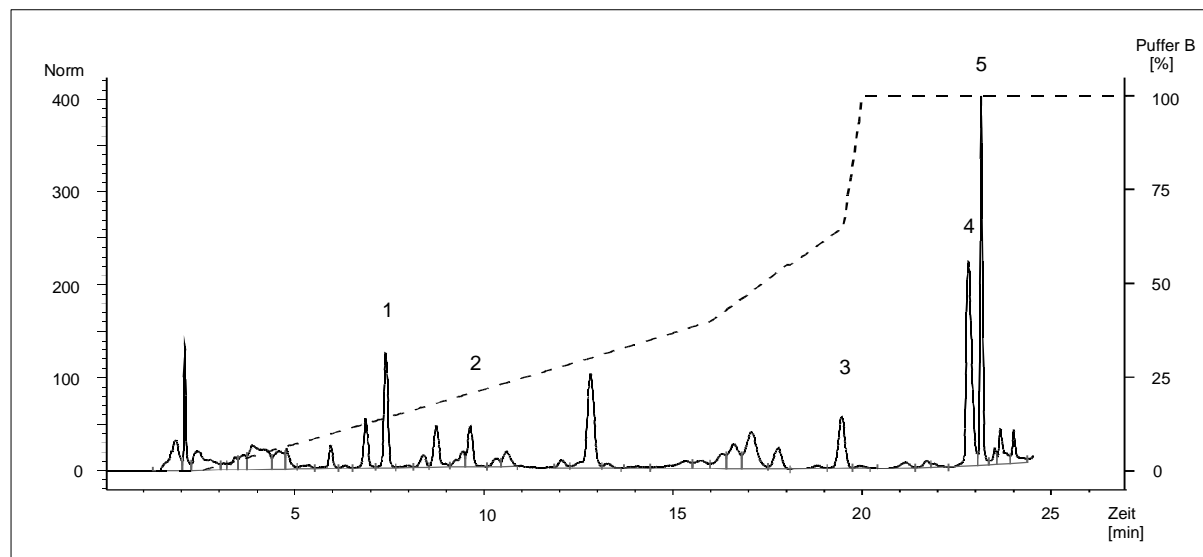


Figure 8: HPLC-Chromatogramm eines Zellextraktes nach saurem Aufschluß von *Escherichia coli* TG1 Zellen aufgetragen auf eine Reversed Phase Säule bei 22°C mit einem Methanolgradienten; --- Gradientenverlauf Puffer B; 1 = NAD; 2 = AMP; 3 = ADP; 4 = cAMP; 5 = ATP

3.5.7 Extraktion für die Methylglyoxal-Bestimmung

Zur Bestimmung der Methylglyoxal-Konzentration nach einer Methode von Chaplen et al. (1996a, 1996b) wurden die Proben direkt während der Probenahme mit Perchlorsäure extrahiert und anschließend abzentrifugiert. Der Überstand wurde über eine C-18 SPE-Säule (Waters Sep-Pak C18; Fa. Millipore) gegeben, die zuvor mit Acetonitrile und dann mit 10 mmol l⁻¹ KH₂PO₄ gespült wurde. Das Eluat wurde mit -Phenyldiamine (9,5 µmol) zum Derivatisieren versetzt. Zusätzlich wurden 5-Methylquinoxaline (25 nmol) und 2,3-Dimethylquinoxalin (10 nmol) dazugegeben, die zur Quantifizierung als interne Standards dienen. Nach 15 h bei 25°C wurden die Proben zum Aufkonzentrieren wieder über eine C-18 SPE-Säule gegeben, mit KH₂PO₄ gespült und mit Acetonitrile eluiert. Das Auftragen des Eluats auf die HPLC Adsorbosphäre C-18 Säule (Fa. Alltech) erfolgte bei 20°C, wobei die mobile Phase aus 68 v/v %

10 mmol l⁻¹ KH₂PO₄ und 32 v/v % Acetonitril bestand. Das entstandene 2-Methylquinoxalin konnte dann mit Hilfe der aufgenommenen Spektren identifiziert und anhand der internen Standards 5-Methylquinoxalin bzw. 2,3-Dimethylquinoxalin quantifiziert werden.

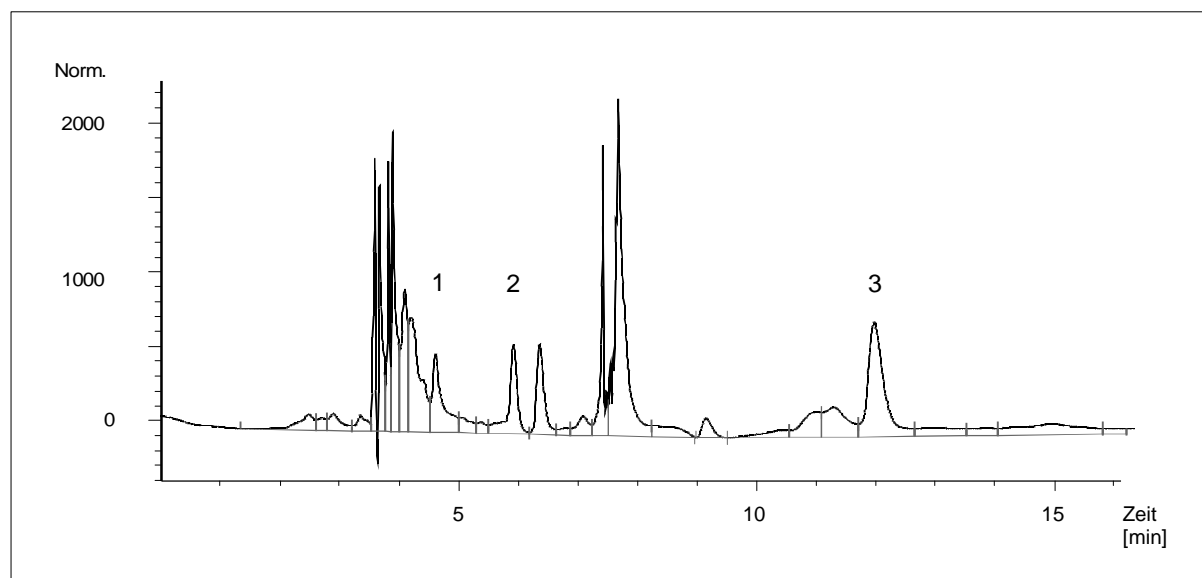


Figure 9: HPLC-Chromatogramm eines sauren Zellextraktes von *Escherichia coli* TG1 nach der Derivatisierung und Aufkonzentration auf eine Adsorbosphäre-Säule bei 20°C aufgetragen mit einem Phosphat-Acetonitril Gemisch (68:32 v/v); 1 = 2-Methylquinoxalin; 2 = 2,3-Dimethylquinoxalin; 3 = 5-Methylquinoxalin

3.5.8 Quantitative Bestimmung von bFGF

Die Identifizierung und Quantifizierung von bFGF erfolgte nach der Methode von Seeger et al. (1995), bei der das Protein durch eindimensionale Sodium-Dodecyl-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) isoliert wird. Die Trennung basiert auf den unterschiedlichen Molekulargewichten. Aufgrund des Polyacrylamidgradienten - der einem Gradienten in der Porengröße des Gels entspricht - werden die mit SDS assoziierten Proteine entsprechend ihrer Größe bei der Bewegung im elektrischen Feld im Gel zurückgehalten.

Sämtliche Aufarbeitungsschritte wurden bei 4°C im Eisbad oder Kühlraum durchgeführt, um eine Degradation und Aggregation des Proteins zu vermeiden. Das Pellet von 1ml Kultivierungsprobe

wurde mit 50 mmol l⁻¹ Phosphatpuffer (pH 7) auf eine optische Dichte von OD₆₀₀ = 3 - 6 eingestellt. Anschließend wurde die Probe mittels Ultraschall (Labsonic 2000, Fa. Braun) aufgeschlossen. Eine Erhitzung der Proben wurde vermieden, indem alle 1,5 min eine Pause gemacht wurde, um die Proben 30 s zu kühlen.

Die Proben wurden mit dem Proben-Puffer (7% w/v SDS, 35% w/v Glycerol, 150 mmol l⁻¹ DTT, 250 mmol l⁻¹ Tris/HCl pH 6,8) im Verhältnis 15:20 gemischt und 10 min im Thermomixer (Modell 5436, Fa. Eppendorf) auf 95°C erhitzt. 10 µl dieser Probe wurde auf ein FAST-Gel (Excel-Gel 8-18, Fa. Pharmacia) aufgetragen und im elektrischen Feld bei 500 V und 50 mA aufgetrennt. Die Färbung erfolgte dann mit Coomassie Brilliant Blue R250 (Fa. Serva) nach den Angaben des Herstellers. BFGF konnte anschließend densitometrisch (Hirschmann elscript 400) bei 546 nm quantifiziert werden. Die Kalibriergerade wurde durch Rinderserumalbumin mit Konzentration zwischen 20 - 100 mg l⁻¹ aufgenommen.

3.6 Berechnung von Prozeßparametern

3.6.1 Ertragskoeffizienten

Die Ertragskoeffizienten Y [g_{BTM} g⁻¹] geben einen Anhalt, wie effizient der Organismus die angebotenen Substrate nutzt. Die Biomasseertragskoeffizienten berechnen sich aus der erzeugten Biomasse X [g l⁻¹] pro aufgenommenem Substrat (als Substrat S wird die Kohlenstoffquelle (Glucose) [g l⁻¹] bezeichnet) oder Sauerstoff O [g l⁻¹] bzw. pro produziertem Kohlendioxid CO₂ [g l⁻¹]. Die substratbezogenen und sauerstoffbezogenen Ausbeutekoeffizienten werden häufig zur Charakterisierung des aeroben Wachstums von Mikroorganismen herangezogen, wobei die Parameter nicht unabhängig voneinander sind (Stouthamer und van Verseveld, 1986).

$$Y_{X/S} = \frac{X}{S} \quad (3.4)$$

$$Y_{X/O} = \frac{X}{O_2} \quad (3.5)$$

$$Y_{X/CO_2} = \frac{X}{CO_2} \quad (3.6)$$

Nach Pirt (1975) kann der Einfluß des Erhaltungsstoffwechsels (Maintenance) auf den Ertragskoeffizienten $Y_{X/S}$ [$g_{BTM} g_S^{-1}$] durch folgende Gleichung ausgedrückt werden:

$$Y_{X/S} = Y_{X/S}^{\max} \cdot \frac{\mu}{\mu + m \cdot Y_{X/S}^{\max}} \quad (3.7)$$

wobei $Y_{X/S}^{\max}$ für den maximalen Biomasseertragskoeffizient [$g_{BTM} g_S^{-1}$], μ für die Wachstumsrate [h^{-1}] und m für den Maintenance-Koeffizient [$g_S g_{BTM}^{-1} h^{-1}$] steht.

3.6.2 Massenbilanzen

Eine wichtige Methode, die Genauigkeit der Analytik zu überprüfen, ist das Erstellen von Massenbilanzen. Durch das wäßrige Medium wird eine Bilanzierung von Wasserstoff und Sauerstoff undurchführbar, da das durch die Bakterien entstehende Wasser im Vergleich zur Umgebung eine zu geringe Menge darstellt.

$$C\text{-Bilanz} = \frac{\frac{Q_{BTM}}{MW_{BTM}} \cdot \alpha_C^{BTM} + Q_{CO_2} + Q_{Ac}}{Q_{Glc} \cdot \alpha_C^{Glc}} \quad (3.8)$$

$$N\text{-Bilanz} = \frac{Q_{BTM} \cdot \alpha_N^{BTM}}{Q_{NH_3} \cdot MW_{BTM}} \quad (3.9)$$

In die Kohlenstoffbilanz gehen die aufgenommene Glucose Q_{Glc} [$mol\ l^{-1} h^{-1}$] und die entstandenen Produkte Kohlendioxid Q_{CO_2} [$mol\ l^{-1} h^{-1}$] und organische Säuren (Essigsäure) Q_{Ac} [$mol\ l^{-1} h^{-1}$] ein. Der assimilierte Teil des Kohlenstoffs wurde aus der Biomassebildungsrate Q_{BTM} [$g\ l^{-1} h^{-1}$], dem Molekulargewicht der Biomasse MW_{BTM} [$g\ mol^{-1}$] und dem Kohlenstoffgehalt der Biomasse α_C^{BTM} [$mol_C\ mol_{BTM}^{-1}$] ermittelt. Für die Stickstoffbilanz werden das verbrauchte Ammonium Q_{NH_3} [$mol\ l^{-1} h^{-1}$] und der assimilierte Stickstoffanteil, der aus der Biomassebildungsrate Q_{BTM} [$mol\ l^{-1} h^{-1}$], dem Molekulargewicht MW_{BTM} [$g\ mol^{-1}$] und dem Stickstoffgehalt der Biomasse

$\alpha_{\text{N}}^{\text{BTM}}$ [$\text{mol}_{\text{N}} \text{mol}_{\text{BTM}}^{-1}$] berechnet wurde, berücksichtigt. Für eine vollständige Bilanz müssen alle Produkte quantitativ erfaßt werden. Bei einer Abweichung von über 5 % sollte die Analytik überprüft werden und gegebenenfalls weitere Produkte gesucht werden.

4. Ergebnisse und Diskussion

Dieses Kapitel ist in zwei Abschnitte unterteilt, wobei sich der erste mit der kontinuierlichen Kultivierung von *E. coli* TG1 befaßt, während im zweiten die Ergebnisse von Hochzelldichtekultivierungen eines rekombinanten *E. coli* TG1 Stammes dargestellt werden. Der erste Teil umfaßt zwei Teilabschnitte, die sich zum einen mit stationären und zum anderen mit dynamischen Zuständen bei kontinuierlichen Kultivierungen befaßt. Mit den aus den stationären Zuständen berechneten Stoffwechselraten wurde ein Stoffflußmodell für die intrazellulären Flußverteilungen erstellt. Im zweiten Teilabschnitt wurden die zellulären Reaktionen auf Veränderungen der Durchflußrate untersucht, um weitere Erkenntnisse über den Bakterienstoffwechsel zu gewinnen. Dabei wurde die Übergangsphase von einem Fließgleichgewicht zum anderen beobachtet. Außerdem wurden die Oszillationen studiert, die als Folge großer Erhöhungen der Durchflußrate auftraten.

Im zweiten Hauptabschnitt werden die Ergebnisse der Hochzelldichtekultivierung eines rekombinanten *Escherichia coli* Stammes dargestellt. Dabei wurde das Hauptaugenmerk auf den Energiestoffwechsel des rekombinanten *E. coli* Stammes während der Hitzeinduktion der bFGF-Produktion gelegt.

4.1 Fließgleichgewicht im Chemostaten

4.1.1 Wachstumskinetik

Die Kinetik des Bakterienwachstums im Chemostaten unter substratlimitierten Bedingungen läßt sich durch verschiedene Gesetze beschreiben (Senn et al., 1994), wobei eines der ersten von Monod (1947) entwickelt wurde (Gleichung 2.1). Durch Auswaschversuche erfolgte die Ermittlung der maximalen oder auch kritischen Durchflußrate von $D_{\text{krit}} = 0,425 \text{ h}^{-1}$ für *Escherichia coli* TG1, was einer Verdoppelungszeit von $t_d = 98 \text{ min}$ entspricht. Die Substratkonzentration für die halbmaximale Wachstumsrate $K_s = 0,004 \text{ g l}^{-1}$ wurde aus der Literatur (Neijssel et al., 1986) übernommen, da das Bestimmen dieses Koeffizienten

im Chemostaten mit zu großen Fehlern behaftet wäre.

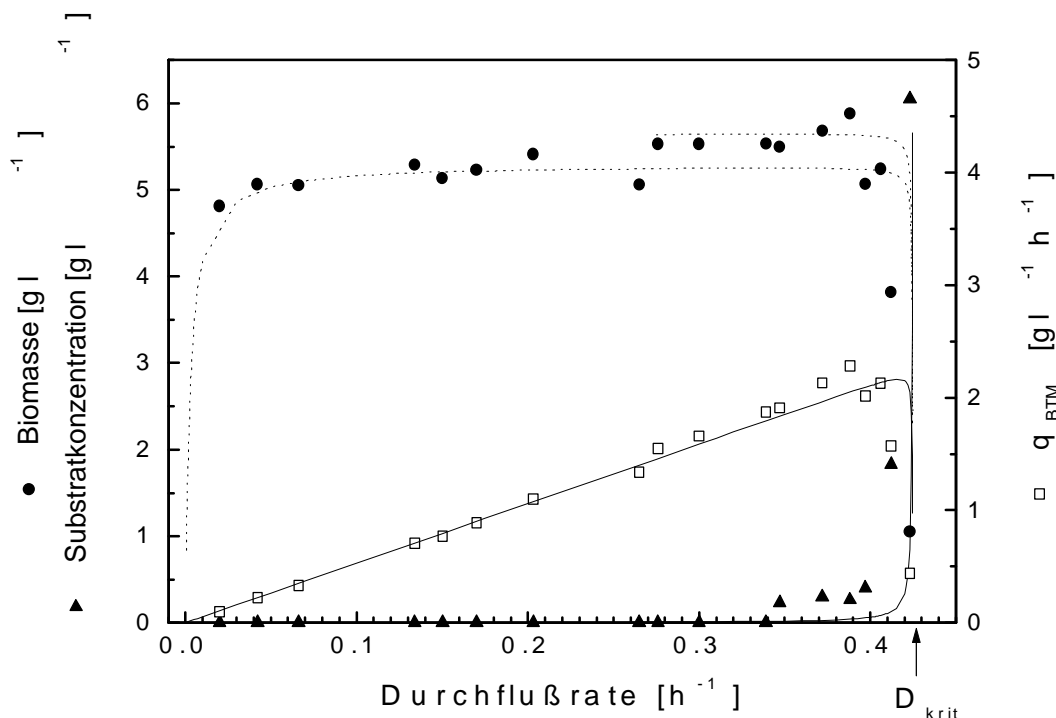


Figure 10: Beziehungen zwischen Bakteriendichte, Substratkonzentration und Bakterienenertrag im Chemostaten bei verschiedenen Durchflußraten von *Escherichia coli* TG1

Bei Durchflußraten zwischen $D = 0,28 \text{ h}^{-1}$ und $D = 0,39 \text{ h}^{-1}$ kam es zur verstärkten Bildung von Biomasse, so daß die gemessenen Werte oberhalb der errechneten lagen. Erst nahe der kritischen Durchflußrate $D_{\text{krit}} (= \mu_{\text{max}})$ nahm die Biomasse ab, bis es bei $D = 0,425 \text{ h}^{-1}$ zum vollständigen Auswaschen der Zellen kam. Die Biomasse ließ sich bei niedrigen Wachstumsraten mit Hilfe der Gleichung 2.5 und einem Ertragskoeffizienten von $Y_{X/S}^{\text{max}} = 0,53 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ g}_{\text{Gluc}}^{-1}$ darstellen, während bei hohen Durchflußraten eine bessere Anpassung mit $Y_{X/S}^{\text{max}} = 0,56 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ g}_{\text{Gluc}}^{-1}$ erzielt wurde.

4.1.2 Organische Säuren

Bei niedrigen Wachstumsraten konnten keine organischen Säuren nachgewiesen werden, sondern erst bei hohen Durchflußraten, bei denen die Biomassebildungsrate schon wieder abnahm, konnten nennenswerte Mengen an Essigsäure detektiert werden (Abb. 11).

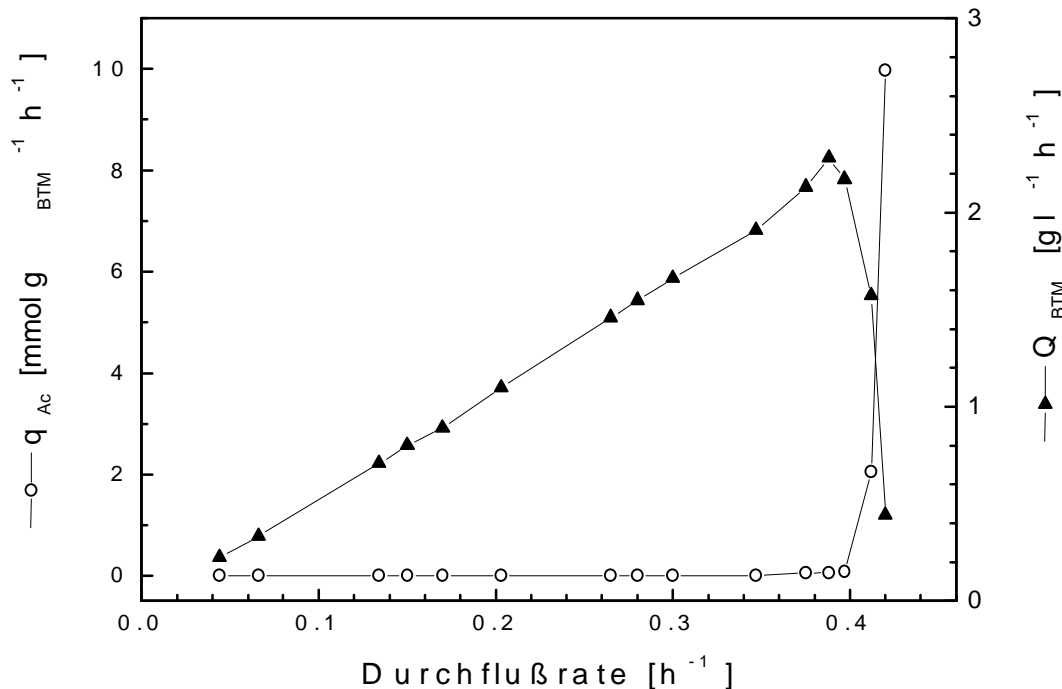


Abbildung 11: Essigsäurebildungsrate q_{Ac} und Biomassebildungsrate Q_{BTM} bei *E. coli* TG1 im Chemostaten unter aeroben, glucoselimitierten Bedingungen

Die Bildung organischer Säuren deutet auf eine unvollständige Oxidation der Glucose hin, die stattfindet, wenn die Kapazität des Stoffwechsels nicht mehr ausreicht, den Zucker vollständig abzubauen. Diese unvollständige Oxidation der Glucose wird häufig bei Sauerstofflimitierung beobachtet, kann aber auch ein Hinweis auf eine Flaschenhalsreaktion im Stoffwechsel sein (Tempest und Neijssel, 1992). Bei diesen geschwindigkeitsbestimmenden Reaktionen (Flaschenhals-Reaktionen) kann es zu einem kurzzeitigem Anstau von Metaboliten kommen, der dann zu einer Ausweichreaktion führt, wobei verschiedene Säuren - Lactat (Stryer, 1988); Essigsäure (Majewski und Domach, 1990a); Glutamat (Broda, 1968) etc. - entstehen können. Bei *Escherichia coli* wird am häufigsten die Essigsäurebildung beobachtet (Doelle et al., 1982; Reiling et al., 1985; Kleeman und Strohl, 1994).

Für die Essigsäurebildung werden verschiedene Gründe diskutiert: (i) Limitierung in der Atmungskette (Reiling et al., 1985), (ii) Limitierung des Tricarbonsäurezyklus (Doelle et al.,

1982), (iii) eine Kombination aus einer Limitierung durch das Elektronentransportsystem und durch den Tricarbonsäurezyklus (Majewski und Domach, 1990a). Eine weiterführende Erklärung von Han et al. (1992) geht von einer Umorganisation des Stoffwechsels aus, da die limitierte Kapazität des oxydativen Stoffwechsels - insbesondere des Tricarbonsäurezyklus - bei hohen Wachstumsraten nicht mehr den Bedarf von Anabolismus und Katabolismus erfüllen kann. Der Stoffwechsel wird so umgestellt, daß in erster Linie die Deckung der anabolen Bedürfnisse gewährleistet ist, wobei für den katabolischen Bereich der Abbauweg mit der nächsthöheren Energieausbeute gewählt wird: die Oxidation der Glucose zu Essigsäure.

Um die möglichen Gründe für die unvollständige Oxidation einzugrenzen, wurde eine Limitierung durch die Atmung überprüft, indem eine Bilanz der Reduktionsäquivalente erstellt wurde. Das Paritätsdiagramm (Abb. 12) zeigt deutlich, daß über den gesamten Bereich die Bilanz vollständig war, d.h. die reduzierten Äquivalente wurden vollständig in der Atmungskette oxidiert, so daß davon ausgegangen werden kann, daß über den gesamten Bereich keine Nebenreaktion nennenswert an der Oxidation der Reduktionsäquivalente beteiligt war. Damit ist eine Limitierung durch die Atmungskette als alleinige Erklärung genauso auszuschließen wie die Akkumulation von NADH_2 . Eine weitere Kontrolle, ob die Atmungskette limitierend wirkte, war das Zugeben zusätzlicher Glucose im Fließgleichgewicht. Bei allen Durchflußraten war eine sofortige Erhöhung der Sauerstoffaufnahme zu beobachten, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die Kapazität nicht vollständig ausgenutzt wurde. Am wahrscheinlichsten erscheint daher die Erklärung von Han et al. (1992), die von einer Umorganisation des Stoffwechsels ausgeht.

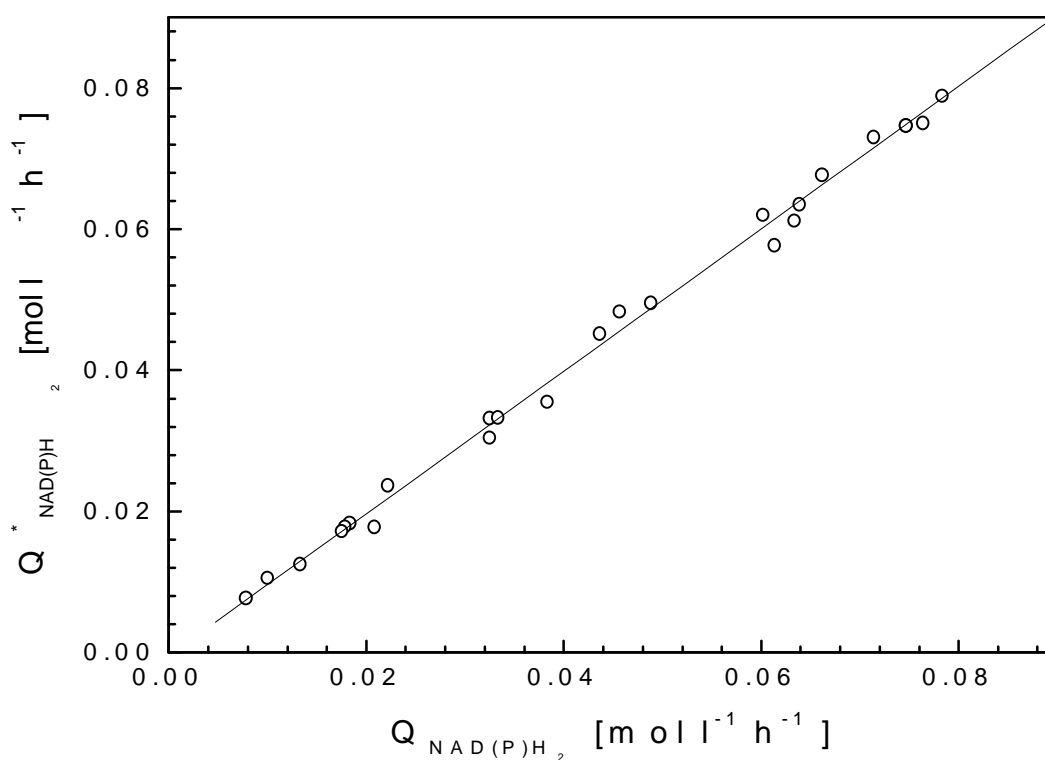


Abbildung 12: Paritätsdiagramm der NAD(P)H₂-Verbrauchsrate $Q^*_{\text{NAD(P)H}_2}$ über der NAD(P)H₂-Bildungsrate $Q_{\text{NAD(P)H}_2}$ bei *Escherichia coli* TG1

4.1.3 Elementare Zellzusammensetzung

Die Elementaranalyse ergab, daß die elementare Zusammensetzung der Zellen von *Escherichia coli* TG1 in den Versuchen bei allen Durchflußraten konstant blieb (Abb. 13). Der gemessene Kohlenstoffanteil lag mit $42,5 \pm 1,5 \%$ etwas unter dem ansonsten allgemein für Enterobakterien angegebenen Wert (45-50 %; Schlegel, 1984). Der Sauerstoffanteil lag bei $32,5 \pm 2 \%$, der Stickstoffanteil bei $10,9 \pm 0,5 \%$ und der Wasserstoffanteil bei $6,6 \pm 0,25 \%$. Daraus ergab sich für die Biomassezusammensetzung folgende Formel: $\text{CH}_{1,85}\text{O}_{0,574}\text{N}_{0,22}$. Diese Zusammensetzung ist dicht an dem für eine Vielzahl von Bakterien angegebenen Mittelwert von $\text{CH}_{1,8}\text{O}_{0,5}\text{N}_{0,2}$ (Roels, 1980). Die Elemente C, H, N und O geben 88 % der Biotrockenmasse wieder, so daß sich als molare Masse der Biotrockenmasse $29,675 \text{ g c-mol}^{-1}$ ergab.

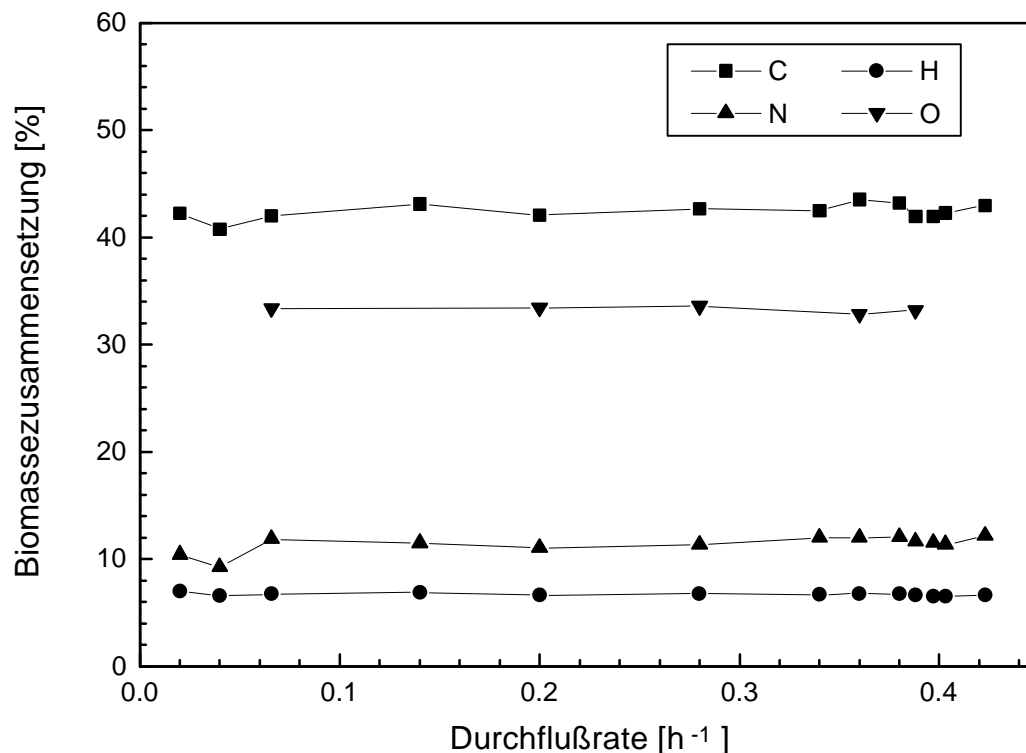


Abbildung 13: Elementare Zusammensetzung der Biotrockenmasse von aerob wachsenden *Escherichia coli* TG1 Zellen

4.1.4 Ertragskoeffizienten und Bilanzen

Die Effizienz des aeroben Wachstums von Bakterien wird häufig durch zwei Parameter charakterisiert, die nicht unabhängig voneinander sind: den substratbezogenen und den sauerstoffbezogenen Biomasseertragskoeffizienten (Stouthamer und van Verseveld, 1986). Wichtig bei der Betrachtung dieser Parameter ist eine genaue elementare Bilanz, die dann auch eine Abschätzung über die Güte der Messung zuläßt.

Bei einigen Durchflußraten schwankten die Werte der bestimmten Biotrockenmassen sehr stark, so daß die Biomasse aus der optischen Dichte mit Hilfe der vorher errechneten Korrelation (3.5.2) berechnet wurden. Die Bilanzen gingen bis auf die Bilanzen der beiden höchsten Durchflußraten, bei denen noch ein Fließgleichgewicht erreicht werden konnte ($0,41 \text{ h}^{-1}$ und

0,415 h⁻¹) im Rahmen der Messgenauigkeit auf. Da die Stickstoffbilanz keine so hohen Defizite aufwies, war die Abweichung bei den hohen Flußraten auf die Abgasanalytik zurückzuführen. Durch die niedrigen Abgaswerte traten hohe Meßungenauigkeiten auf, die sich dann auf die Bilanz niederschlugen.

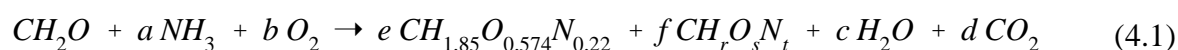
Tabelle 4: Bilanzen von Kohlenstoff, Stickstoff und verfügbaren Elektronen (ave) für *Escherichia coli* im Chemostaten mit einer Glucosekonzentration von 0,055 mol l⁻¹ im Zufütterungsmedium; Kohlenstoffanteil der Biotrockenmasse $\alpha_C = 0,425 \text{ mol mol}_{\text{BTM}}^{-1}$ und Stickstoffanteil $\alpha_N = 0,109 \text{ mol mol}_{\text{BTM}}^{-1}$

D	BTM	Glucose Abfluß	Acetat	Q _{CO2}	Q _{NH4}	C- Bilanz	N- Bilanz	ave Bilanz
h ⁻¹	g l ⁻¹	mol l ⁻¹	mol l ⁻¹	mol l ⁻¹ h ⁻¹	mol l ⁻¹ h ⁻¹	%	%	%
0,044	5,07	0	0	0,0065	0,00169	99,18	103,71	98,19
0,066	5,05	0	0	0,01	0,00261	100,11	100,34	103,18
0,134	5,29	0	0	0,021	0,00557	104,26	99,99	97,86
0,15	5,339	0	0	0,0208	0,00625	99,32	100,68	86,21
0,17	5,23	0	0	0,0253	0,00703	101,23	99,37	96,21
0,203	5,41	0	0	0,029	0,00869	101,35	99,30	98,50
0,265	5,5	0	0	0,0349	0,0113	98,94	101,34	84,00
0,28	5,53	0	0	0,0381	0,01213	100,58	100,30	95,81
0,3	5,53	0	0	0,0408	0,01313	100,56	99,28	95,77
0,347	5,5	0,00127	0	0,0418	0,01510	97,79	99,31	96,14
0,375	5,685	0,00164	0,00080	0,0429	0,01688	98,87	99,23	94,26
0,388	5,88	0,00144	0,00085	0,0448	0,01819	101,00	98,55	97,27
0,397	5,47	0,00221	0,00104	0,0458	0,01688	97,91	101,08	92,08
0,41	3,817	0,01012	0,019	0,0105	0,01286	66,77	95,62	74,10
0,415	1,05	0,0336	0,025	0,0047	0,00357	57,25	95,90	99,12

Da ansonsten sowohl die Kohlenstoff- als auch die Stickstoffbilanz im Rahmen der Meßgenauigkeiten aufging (Tabelle 4), kann davon ausgegangen werden, daß alle kohlenstoff-

und stickstoffhaltigen Substanzen analytisch erfaßt wurden. Das verbrauchte Stickstoff wurde ausschließlich zur Biomassebildung verwendet, während bei der Kohlenstoffbilanz bei hohen Durchflußraten auch Essigsäure neben der Biomasse- und Kohlendioxidbildung einbezogen werden mußte.

Die Beziehung zwischen dem Verbrauch von Glucose, Stickstoff und Sauerstoff sowie der Bildung von Biomasse, Produkt (Essigsäure) und Kohlendioxid läßt sich durch Bilanzierung der einzelnen Elemente ermitteln. Die stöchiometrischen Verhältnisse lassen sich folgendermaßen beschreiben (de Kok und Roels, 1980):



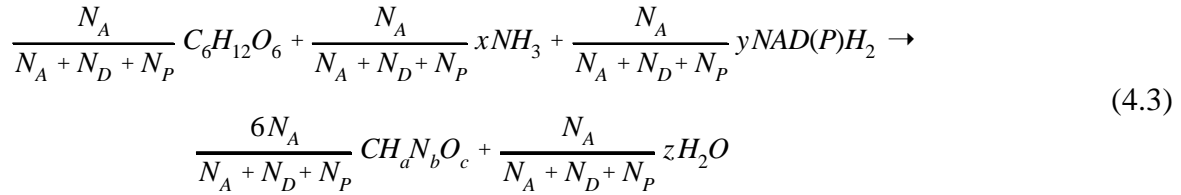
wobei e und f die Fraktionen der C-Quelle angeben, die in Biomasse bzw. Produkt gewandelt werden, während die anderen Koeffizienten a-d die jeweiligen Anteile der weiteren Substrate (Ammoniak und Sauerstoff) bzw. Nebenprodukte (Kohlendioxid und Wasser) pro verbrauchter C-Quelle angeben. *Escherichia coli* TG1 bildete im Chemostaten erst bei hohen Durchflußraten als einziges Produkt geringe Mengen an Essigsäure. Unter Berücksichtigung der Reduktionsgrade der Substrate und Produkte können die verfügbaren Elektronen (available electrons = ave) bilanziert werden (Stouthamer und van Verseveld, 1986):

$$S - 4b = e_{BM} + z_P \quad (4.2)$$

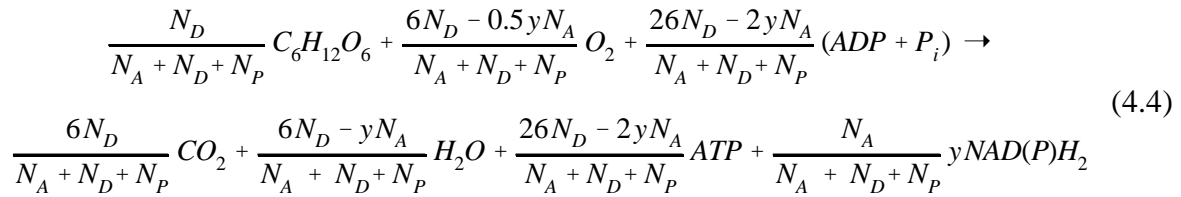
Dabei gibt die Anzahl der verfügbaren Elektronen pro g Kohlenstoff des Substrats Glucose (S), des Produkts (P) bzw. der Biomasse (BM) an, basierend auf den Zahlen Kohlenstoff = 4, Wasserstoff = 1, Sauerstoff = -2 und Stickstoff = -3. Die Berechnung der Elektronenbilanz diene ausschließlich der Überprüfung der Datenkonsistenz. In Tabelle 4 sieht man, daß diese Bilanz der verfügbaren Elektronen im Rahmen der Meßgenauigkeit aufging.

Durch Erweiterung der Gleichung 4.1 lassen sich die genauen Anteile an dissimilierter und assimilierter Glucose und den daran beteiligten Reduktions- und Energieäquivalenten ermitteln:

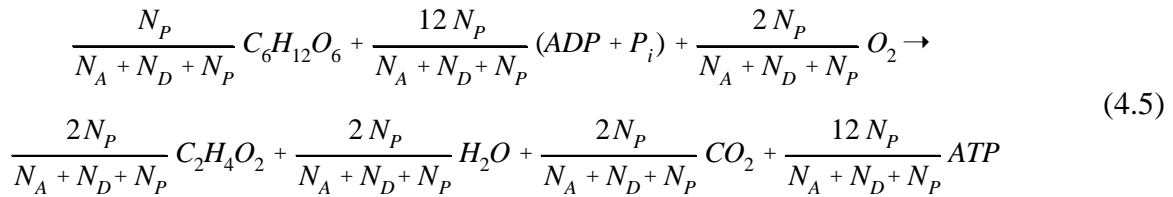
Assimilation der Glucose:



Dissimilation der Glucose:



Produktbildung:



Dabei stellen $N_D \cdot (N_A + N_D + N_P)^{-1}$, $N_A \cdot (N_A + N_D + N_P)^{-1}$ $N_P \cdot (N_A + N_D + N_P)^{-1}$ den jeweiligen Anteil der Glucose dar, der dissimiliert, assimiliert bzw. zur Produktbildung genutzt wurde. Die in der Glucosedissimilation und bei der Essigsäurebildung reduzierten Reduktionsäquivalente wurden zum Teil zur Biomassebildung genutzt, während der Hauptteil in der oxydativen Atmungskette der ATP-Regeneration diente. Bei Kenntnis der Elementarzusammensetzung sowie der Anteile der Glucose, die entweder dissimiliert oder zur Produktbildung genutzt wurden, können die stöchiometrischen Koeffizienten x, y, z berechnet werden. Die Produktbildung läßt sich aus der Acetatbildungsrate Q_{Ac} [mol l⁻¹ h⁻¹] und der Glucoseaufnahmerate Q_{Gluc} [mol l⁻¹ h⁻¹] berechnen:

$$\frac{N_P}{N_A + N_D + N_P} = \frac{Q_{Ac}}{2 Q_{Gluc}} \quad (4.6)$$

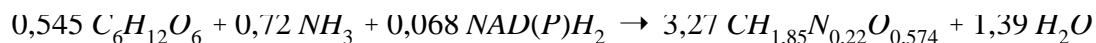
Der Anteil der dissimilierten Glucose wurde aus der Glucoseverbrauchsrate Q_{Gluc} [mol l⁻¹ h⁻¹], der Kohlendioxidbildungsrate Q_{CO_2} [mol l⁻¹ h⁻¹] und der Acetatbildungsrate Q_{Ac} [mol l⁻¹ h⁻¹] errechnet:

$$\frac{N_D}{N_A + N_D + N_P} = \frac{Q_{\text{CO}_2} - Q_{\text{Ac}}}{6 \cdot Q_{\text{Gluc}}} \quad (4.7)$$

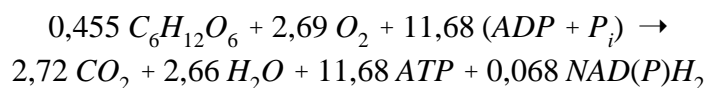
Als Beispiel werden in Tabelle 5 die stöchiometrischen Gleichungen bei drei verschiedenen Durchflußraten (0,066 h⁻¹; 0,203 h⁻¹ und 0,41 h⁻¹) aufgelistet, um zu verdeutlichen, daß die Verteilung zwischen Assimilation und Dissimilation mit Veränderung der Durchflußrate variierte.

Tabelle 5: Stöchiometrie des Glucoseabbaus von *Escherichia coli* TG1 im Chemostaten bei unterschiedlichen Durchflußraten (0,066 h⁻¹; 0,203 h⁻¹ und 0,41 h⁻¹)

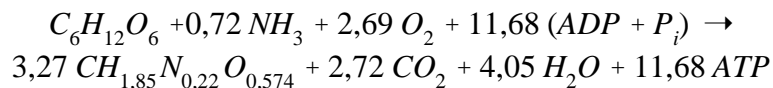
Assimilation der Glucose bei D = 0,066 h⁻¹:



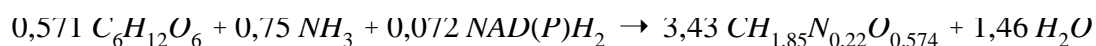
Dissimilation der Glucose bei D = 0,066 h⁻¹:



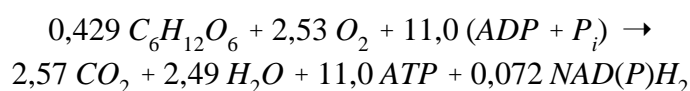
Gesamtstöchiometrie bei D = 0,066 h⁻¹:



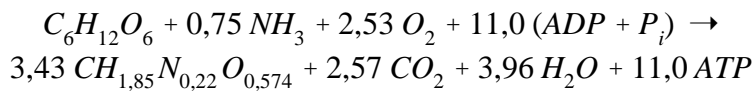
Assimilation der Glucose bei D = 0,203 h⁻¹:



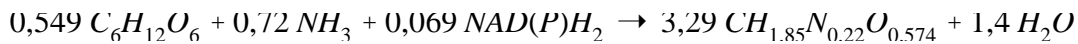
Dissimilation der Glucose bei D = 0,203 h⁻¹:



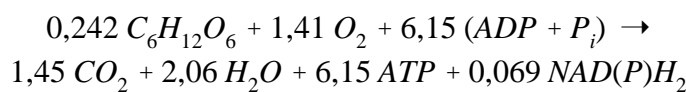
Gesamtstöchiometrie der Glucose bei $D = 0,203 \text{ h}^{-1}$:



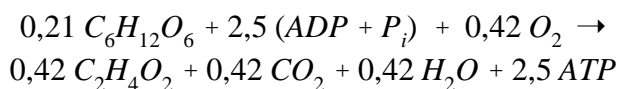
Assimilation der Glucose bei $D = 0,41 \text{ h}^{-1}$:



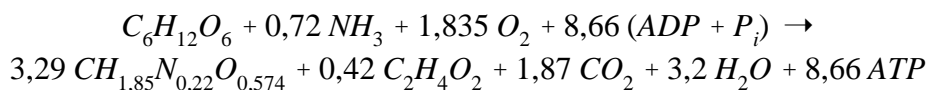
Dissimilation der Glucose bei $D = 0,41 \text{ h}^{-1}$:



Produktbildung bei $D = 0,41 \text{ h}^{-1}$:



Gesamtstöchiometrie der Glucose bei $D = 0,41 \text{ h}^{-1}$:



Die Berechnungen zeigten, daß bei Durchflußraten bis $D = 0,28 \text{ h}^{-1}$ 42,4 % der Glucose dissimiliert und dementsprechend 57,6 % assimiliert wurden. Bei hohen Raten kam es zu verstärkter Assimilation. Diese Verschiebung in den Stoffflüssen konnte auch bei der Biomassebestimmung beobachtet werden (s. 4.1.1.1). Die aus diesen Gleichungen berechneten Biomassen stimmten im Rahmen der Meßgenauigkeiten mit den gemessenen Werten überein.

Escherichia coli wuchs bei niedrigen Durchflußraten mit einem substratbezogenen Biomasseertragskoeffizienten von $Y_{X/S} = 0,53 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ g}_S^{-1}$, welcher bei höheren Verdünnungsraten auf $Y_{X/S} = 0,56 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ g}_S^{-1}$ anstieg. In der Regel werden für *E. coli* Werte zwischen $0,45 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ g}_S^{-1}$ und $0,53 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ g}_S^{-1}$ angegeben (Schulze und Lipe, 1964; Neijssel et al., 1986; Schlieker, 1995), die über den gesamten Bereich konstant bleiben. Der verwendete *E. coli* Stamm wies eine sehr hohe Biomasseausbeute auf, das heißt, er nutzte die angebotene C-Quelle sehr effizient zur Biomassebildung aus. Die Effizienz stieg mit steigender Durchflußrate noch an und es kam dabei

nur zu einer relativ geringen Säurebildung. Dies ist vorteilhaft bei der Verwendung dieses Stammes als Wirtsorganismus, da das Erreichen hoher Zelldichten erwünscht ist ohne eine zu hohe Nebenproduktbildung, insbesondere wachstumshemmender Substanzen.

Aus den stöchiometrischen Beziehungen läßt sich unter Berücksichtigung der molaren Masse der Biotrockenmasse $MW_{BTM} = 29,675 \text{ g mol}^{-1}$ der theoretische sauerstoffbezogene Biomasseertragskoeffizient $Y_{X/O_2} [\text{g}_{BTM} \text{ mol}_{O_2}^{-1}]$ berechnen:

$$Y_{X/O_2} = \frac{6 \cdot N_A \cdot MW_{BTM}}{6 \cdot N_D - 0,5 y \cdot N_A} \quad (4.8)$$

Der Vergleich des theoretisch berechneten Wertes mit den Ergebnissen aus den gemessenen Sauerstoffaufnahmeraten und Biomassebildungsraten zeigte im gesamten Bereich eine gute Übereinstimmung (Abb. 14).

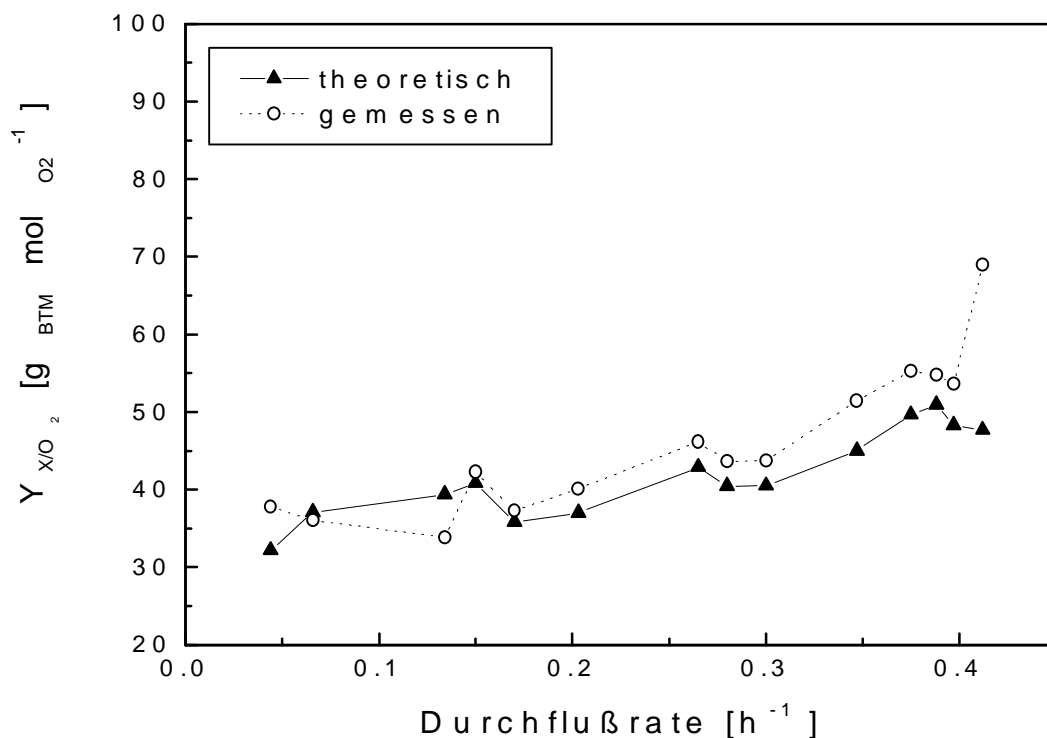


Abbildung 14: Sauerstoffbezogene Biomasseertragskoeffizienten von *Escherichia coli* TG1 in Abhängigkeit von der Durchflußrate

Durch den größer werdenden assimilierten Anteil der Glucose kam es mit steigender Durchflußrate zu einem leichten Anstieg des Ertragskoeffizienten, d.h. es wurde mehr Biomasse pro aufgenommenem Sauerstoff gebildet. Bei höheren Durchflußraten kam es zur verstärkten Nutzung anaboler Stoffwechselwege, um Biomasse zu bilden. Dadurch wurden verstärkt Reduktionsäquivalente im anabolen Stoffwechsel oxidiert und konnten somit nicht in der Atmungskette zur ATP-Regenerierung genutzt werden, was in einer niedrigeren Sauerstoffaufnahme resultierte.

4.1.5 Glucoseaufnahme

Die spezifische Glucoseaufnahme zeigte erwartungsgemäß über den gesamten Bereich eine lineare Abhängigkeit von der Durchflußrate (Abb. 15). Die ermittelte Regressionsgerade ging nicht durch den Ursprung, da auch bei nicht sichtbarem Wachstum eine geringe Menge an Glucose metabolisiert wurde, um die Vitalität aufrecht zu erhalten.

Nach frühen Arbeiten von Neijssel und Tempest (1976) läßt sich aus der Geraden der Maintenance Bedarf m_s [$\text{mol}_{\text{Gluc}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$] und der maximale Biomasseertragskoeffizient $Y_{X/S}^{\max}$ [$\text{mol}_{\text{Gluc}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$] ermitteln:

$$q_{\text{Gluc}} = m_s + \frac{1}{Y_{X/S}^{\max}} \cdot \mu \quad (4.9)$$

In diesen Versuchen verbrauchte *E. coli* $1,65 \cdot 10^{-4}$ mol Glucose pro Stunde zur Erhaltung eines Gramms Biotrockenmasse und der maximale Ertragskoeffizient lag bei $Y_{X/S}^{\max} = 0,59 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ g}_S^{-1}$. Der maximale Ertragskoeffizient entsprach damit den von Paalme et al. (1997) bestimmten maximalen Koeffizienten von $Y_{X/S}^{\max} = 0,593 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ g}_S^{-1}$. Abbildung 15 zeigt, daß bei niedrigen Durchflußraten ca. 35 % der metabolisierten Glucose zur Deckung des Maintenance-Bedarfs benötigt wurde, während bei hohen Flußraten nur noch ca. 5 % für die Erhaltung der Zelle genutzt wurde. Das zeigt, daß bei niedrigen Durchflußraten ein relativ großer Teil der aufgenommenen Glucose ausschließlich der Aufrechterhaltung der Zellvitalität diene. Dies machte sich bei den sehr niedrigen Durchflußraten, wo der Einfluß des Maintenance-Bedarfs

noch sehr hoch war, im Biomasseertragskoeffizienten bemerkbar, der mit $Y_{X/S} = 0,49 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ g}_S^{-1}$ deutlich niedriger war als bei den höheren Flußraten. Das Abnehmen des Einflusses der Erhaltungsenergie mit steigender Durchflußrate wurde nicht nur bei *Escherichia coli* (Neijssel und Tempest, 1976), sondern auch bei anderen Mikroorganismen wie z.B. *Zymomonas mobilis* beobachtet (Lee et al., 1979; Oliviera et al., 1992).

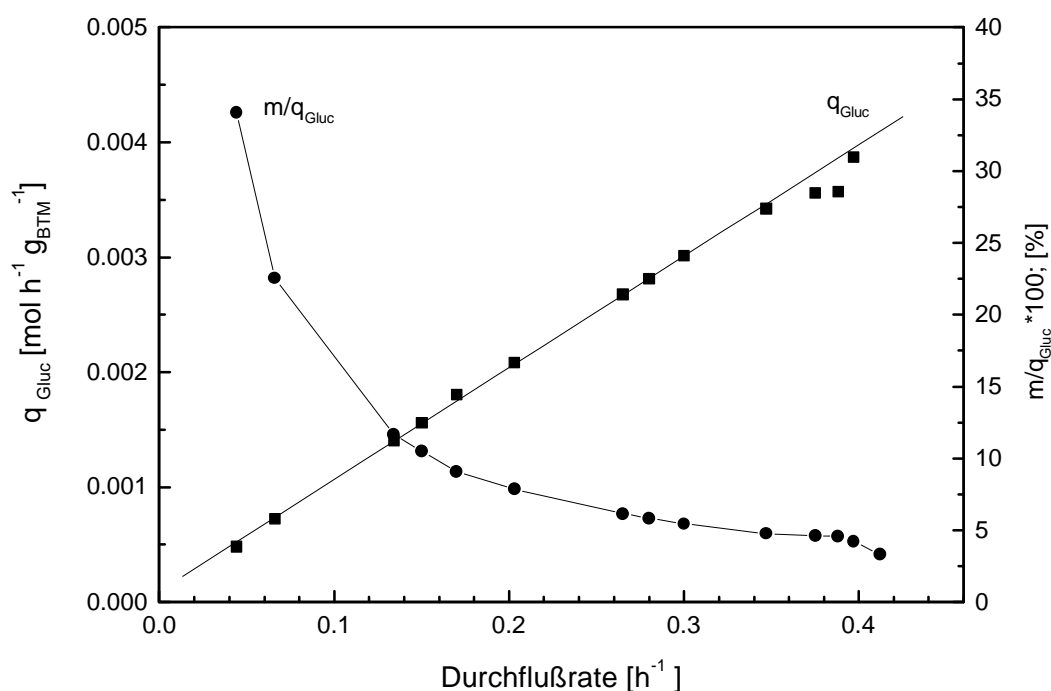


Figure 15: Spezifische Glucoseaufnahme q_{Gluc} und Erhaltungsbedarf m_s pro aufgenommener Glucose bei *Escherichia coli* TG1

Die Biomassebildungsrate Q_{BTM} zeigte bis $D = 0,3 \text{ h}^{-1}$ auch eine lineare Abhängigkeit von der Glucoseaufnahme Q_{Gluc} (Abb. 16). Danach wurde mehr Glucose zur Biomassebildung genutzt, so daß ein Abweichen von der Linearität zu erkennen war. Die Steigung gibt die gebildete Biomasse pro Glucose wieder und entspricht mit $3,31 \text{ mol}_{\text{BTM}} \text{ mol}_{\text{Gluc}}^{-1}$ ungefähr dem Mittelwert der stöchiometrisch ermittelten Werte und umgerechnet in Gramm entspricht dieser Wert dem berechneten $Y_{X/S}$.

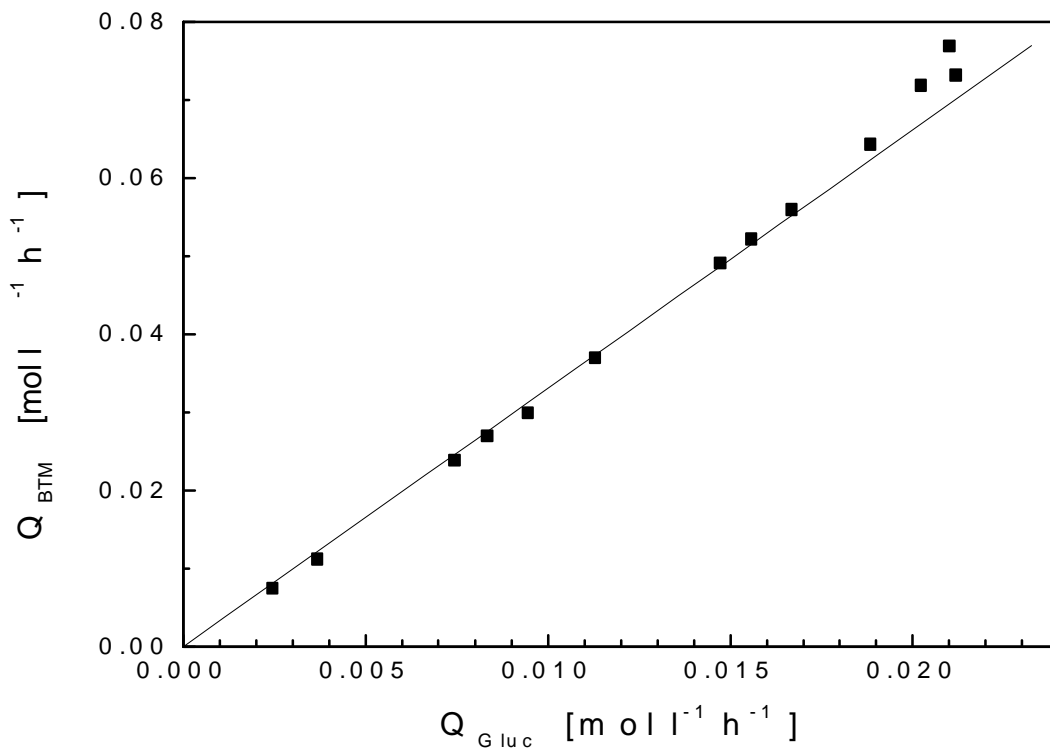


Abbildung 16: Abhängigkeit der Biomassebildungsrate Q_{BTM} von der Glucoseaufnahme rate Q_{Gluc} bei *Escherichia coli* TG1

4.1.6 Atmungsaktivität

Der respiratorische Quotient wurde während der Kultivierung kontinuierlich berechnet, um eine Kontrolle über den Reduktionsgrad des metabolisierten Substrates zu haben. Der RQ blieb über den gesamten Zeitraum relativ konstant bei $1,02 \pm 0,05\ mol_{CO_2}\ mol_{O_2}^{-1}$. Da die Biomasse einen niedrigeren Oxidationsgrad als Kohlendioxid hat, bewirkte die Biomassesynthese einen Anstieg des RQs. Daher liegt bei wachsenden Bakterien, die ausschließlich Glucose metabolisieren, der RQ ein wenig über 1,0. Das heißt, der verwendete *Escherichia coli* Stamm metabolisierte während der gesamten Kultivierung ausschließlich Glucose.

Die spezifische Sauerstoffaufnahme und die spezifische Kohlendioxidbildungsrate zeigten bei niedrigen Durchflußraten eine Linearität (Abb. 17). Der aus der Geraden ermittelte Erhaltungsbedarf m (Neijssel und Tempest, 1976) lag bei 0,35 mmol verbrauchtem Sauerstoff und 0,55 mmol gebildetem Kohlendioxid, um bei einem Gramm Bakterien die Vitalität für eine Stunde aufrecht zu erhalten. Die maximalen Ertragskoeffizienten lagen für *Escherichia coli* TG1 in diesen Versuchen bei $Y_{X/O_2}^{\max} = 42,589 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ mol}_{O_2}^{-1}$ und $Y_{X/CO_2}^{\max} = 43,745 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ mol}_{CO_2}^{-1}$. Der maximale Ertragskoeffizient Y_{X/O_2}^{\max} wird in der Literatur für *Escherichia coli* mit Werten zwischen $44,51 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ mol}_{O_2}^{-1}$ (Calhoun et al., 1993; Paalme et al., 1997) und $59,7 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ mol}_{O_2}^{-1}$ (Farmer und Jones, 1976) angegeben, so daß sich der hier bestimmte Wert mit diesen Ergebnissen deckt. Der Maintenance Bedarf wird von Calhoun et al. (1993) sehr viel höher angegeben ($m_o = 3,2 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$), aber Farmer und Jones (1976) haben einen ähnlichen Bedarf mit $m_o = 0,44 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bestimmt, wie der für *E. coli* TG1 ermittelte.

Ab einer Durchflußrate von $D = 0,3 \text{ h}^{-1}$ kam es durch eine Reduktion der Atmungsaktivität zu einem Abweichen von der Linearität. Da die Bilanz der Reduktionsäquivalente (Abb. 11) aufging, d.h. die anfallenden Reduktionsäquivalente weiterhin vollständig oxidiert wurden, war eine Limitierung in der Atmung auszuschließen, d.h. die Reduktion der Atmungsaktivität mußte auf eine Veränderung im Stoffwechsel zurückzuführen sein. Bei den höheren Durchflußraten kam es zu einer Zunahme der Assimilation, daher wurde weniger Glucose vollständig zu Kohlendioxid oxidiert. Durch die verstärkte Biomassebildung wurden vermehrt Reduktionsäquivalente im Anabolismus oxidiert und damit nicht in der Atmungskette, was die niedrigere Sauerstoffaufnahme erklärte.

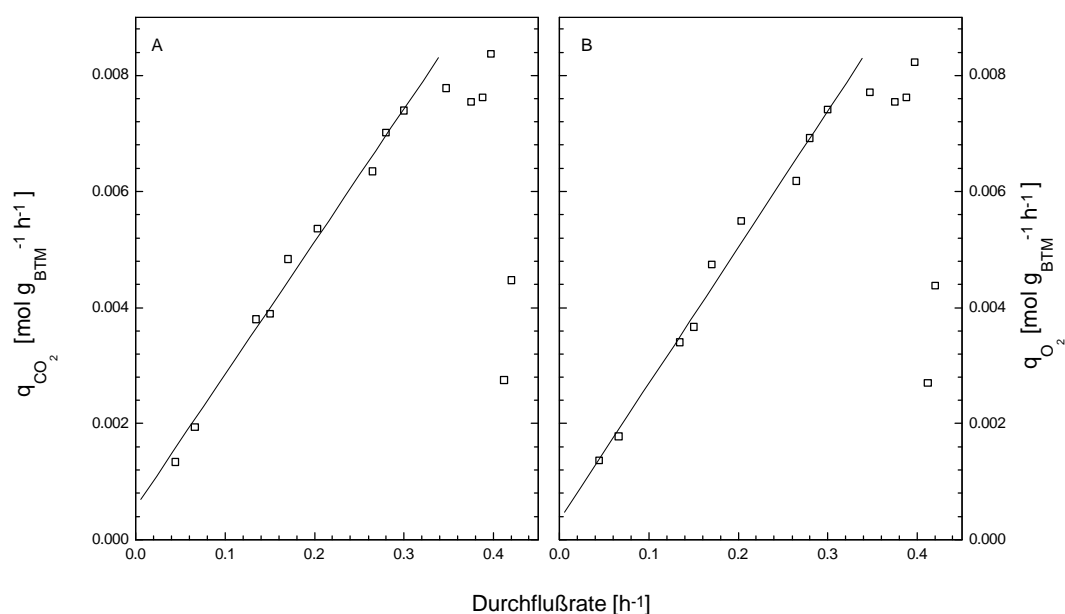


Figure 17: (A) Spezifische Kohlendioxidbildungsrate und (B) spezifische Sauerstoffaufnahme von *Escherichia coli* TG1

4.1.7 Energiestoffwechsel

Bei der Durchflußrate $D = 0,28 \text{ h}^{-1}$ änderte sich sichtlich etwas im Stoffwechsel von *Escherichia coli* TG1. Ab dieser Wachstumsrate kam es zu einer verstärkten Assimilation von Glucose und als Folge zu einer höheren Biomasseausbeute. Gleichzeitig verringerte sich die Atmungsaktivität, so daß weniger Sauerstoff verbraucht und weniger Kohlendioxid gebildet wurde, wobei die anfallenden Reduktionsäquivalente weiterhin vollständig oxidiert wurden.

Eine mögliche Erklärung für die Änderungen könnte in der bivalenten Natur des limitierenden Substrates zu finden sein. Glucose diene *E. coli* sowohl als Kohlenstoffquelle als auch als Energiequelle (Abb. 1), d.h. es können zwei Arten der Limitierung auftauchen: C-Quellen- oder Energiequellenlimitierung. Eine Verschiebung der Limitierungsart mit steigender Durchflußrate und dadurch bedingt eine Veränderung im Stoffwechsel wäre möglich. Um einen weiteren Anhalt über die Art der Limitierung zu erhalten, wurde daher ein besonderes Augenmerk auf den Energiehaushalt der Zelle gelegt.

4.1.7.1 ATP-Bildungsrate

Bei der Berechnung der ATP-Bildungsrate spielen der P/O-Quotient sowie die energetischen Ertragskoeffizienten eine wesentliche Rolle. Bei einer aeroben Kultivierung ist es nicht möglich, diese Parameter experimentell zu ermitteln oder unabhängig voneinander zu berechnen, so daß für die Bestimmung der Ertragskoeffizienten und der ATP-Bildungsrate Annahmen bezüglich des Abbaufweges der Glucose getroffen werden mußten. Für den P/O-Quotienten wurde der mechanistische Wert von $P/O = 2$ angenommen, da die Bestimmung dieses Quotienten nur unter anaeroben Bedingungen möglich ist.

Unter der Voraussetzung, daß der Abbau der Glucose ausschließlich über den Embden-Meyerhof-Parnas Weg erfolgte, konnten aus den stöchiometrischen Daten die energetischen Ertragskoeffizienten Y_{ATP} [$g_{BTM} \text{ mol}_{ATP}^{-1}$] und $Y_{ATP/O}$ [$\text{mol}_{ATP} \text{ mol}_O^{-1}$] nach folgenden Gleichungen berechnet werden:

$$Y_{ATP} = \frac{6 \cdot N_A \cdot MW_{BTM}}{26 \cdot N_D - 2 \cdot y \cdot N_A + 12 \cdot N_P} \quad (4.10)$$

$$Y_{ATP/O} = \frac{26 \cdot N_D - 2 \cdot y \cdot N_A + 12 \cdot N_P}{12 \cdot N_D - y \cdot N_A} \quad (4.11)$$

Die Berechnungen ergaben ein konstanten Wert für $Y_{ATP/O}$ (Abb. 18), der nur gering von dem theoretisch ermittelten Wert von $Y_{ATP/O} = 2,167 \text{ mol}_{ATP} \text{ mol}_O^{-1}$ (Schlieker, 1995) abwich. Mit Zunahme der Durchflußrate kam es hingegen zu einem Anstieg des energetischen Biomasseertragskoeffizienten Y_{ATP} (Abb. 18). Der Anstieg ließ sich auf die reduzierte Glucosedissimilation zurückführen, die bedingte, daß weniger Reduktionsäquivalente in der Atmungskette zur Regeneration von ATP zur Verfügung standen.

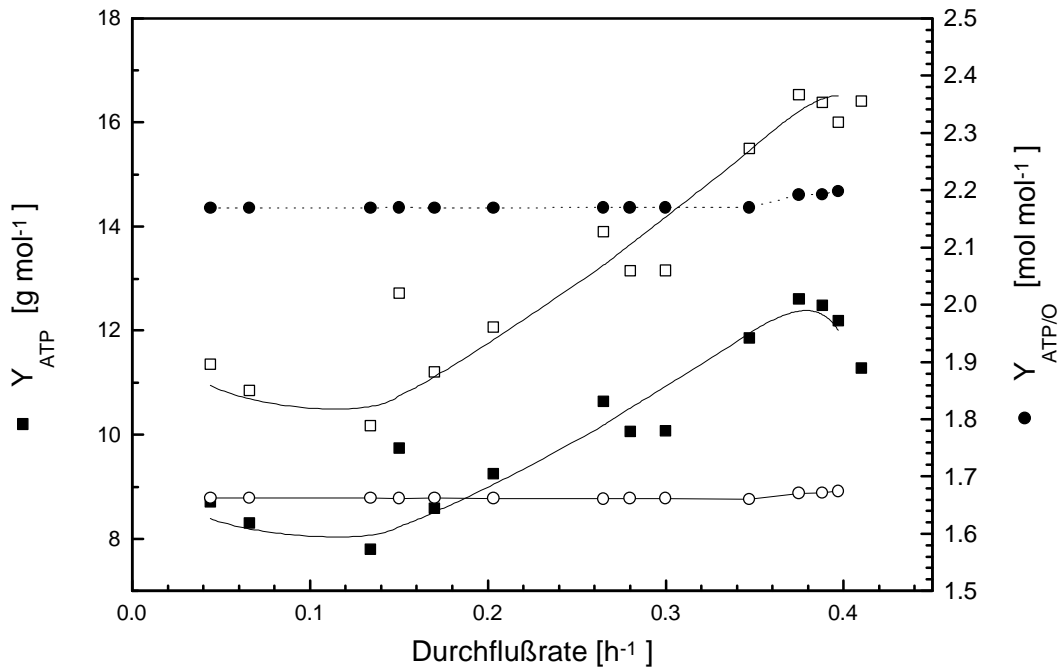


Abbildung 18: Energetische Biomasseertragskoeffizienten Y_{ATP} und sauerstoffbezogene ATP-Ertragskoeffizienten $Y_{ATP/O}$ für den Glucoseabbau über den Embden-Meyerhof-Parnas Weg (EMP; geschlossene Symbole) und den Methylglyoxal-Nebenweg (MGO; offene Symbole)

Erfolgte der Glucoseabbau über den Methylglyoxal-Nebenweg, ergaben sich für die Ertragskoeffizienten Y_{ATP} [$g_{BTM} \text{ mol}_{ATP}^{-1}$] und $Y_{ATP/O}$ [$\text{mol}_{ATP} \text{ mol}_O^{-1}$] folgende Gleichungen:

$$Y_{ATP} = \frac{6 \cdot N_A \cdot MW_{BTM}}{20 \cdot N_D - 2 \cdot y \cdot N_A + 6 \cdot N_P} \quad (4.12)$$

$$Y_{ATP/O} = \frac{20 \cdot N_D - 2 \cdot y \cdot N_A + 6 \cdot N_P}{12 \cdot N_D - y \cdot N_A} \quad (4.13)$$

Unter dieser Voraussetzung lag der sauerstoffbezogene ATP-Ertragskoeffizient $Y_{ATP/O}$ deutlich unter dem Wert, der für den Abbau der Glucose über den Embden-Meyerhof-Parnas Weg ermittelt wurde, während der energetische Biomasseertragskoeffizient Y_{ATP} sichtbar höher war

(Abb. 18). Bei der Nutzung des Methylglyoxal-Nebenweges entstehen sowohl weniger ATP durch Substratkettenphosphorylierung als auch weniger reduzierte Reduktionsäquivalente, so daß die ATP-Ausbeute niedriger ausfällt als beim Abbau der Glucose über den Embden-Meyerhof Parnas Weg. Dies bedingt eine niedrigere ATP-Ausbeute pro aufgenommenem Sauerstoff und gleichzeitig eine höhere Biomasseausbeute.

Zur Bestimmung der ATP-Bildungsrate ist es notwendig den Abbauweg der Glucose zu kennen, da je nach Stoffwechselweg unterschiedliche Mengen an Energie- und Reduktionsäquivalenten entstehen (Tab. 2). Die Berechnung der ATP-Bildungsrate erfolgte für den Embden-Meyerhof-Parnas Weg und den Methylglyoxal-Nebenweg. Dabei wurde davon ausgegangen, daß das DHAP entweder ausschließlich über den Embden-Meyerhof-Parnas Weg oder ausschließlich über den Methylglyoxal-Nebenweg abgebaut wurde. Außerdem wurde noch der Pentose-Phosphat Weg einbezogen, unter der Voraussetzung, daß er genau einmal durchlaufen wurde.

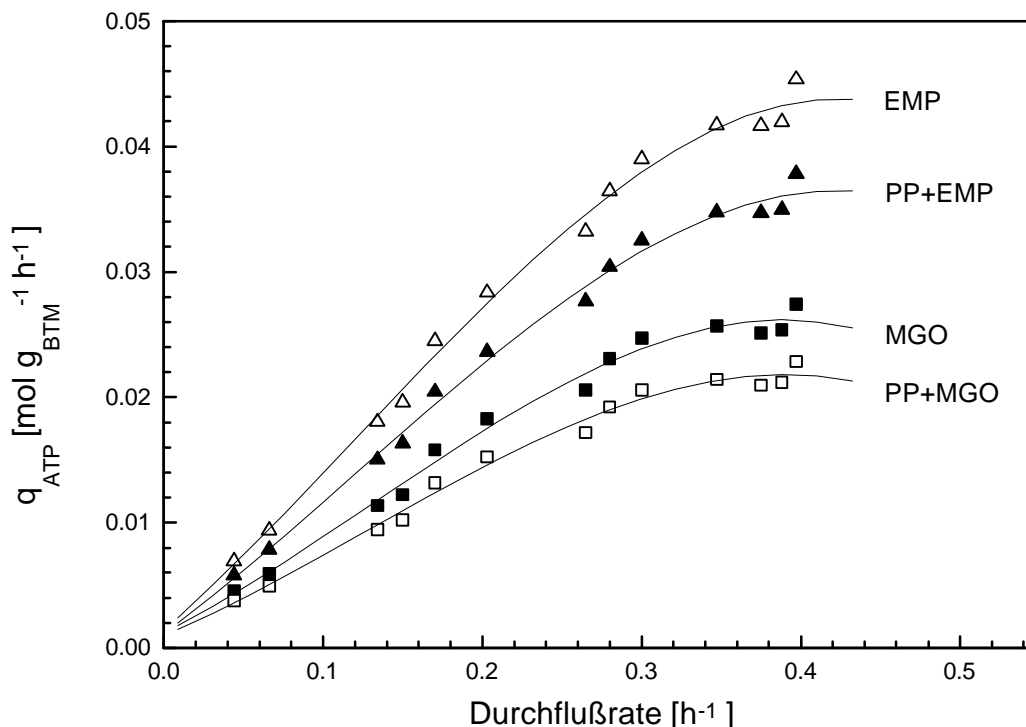


Abbildung 19: ATP-Bildungsraten in Abhängigkeit von den Glucoseabbauwegen; (EMP = Embden-Meyerhof-Parnas Weg; MGO = Methylglyoxal-Nebenweg; PP = Pentosephosphatweg)

Die berechneten ATP-Bildungsraten zeigten je nach Abbauweg der Glucose eindeutig sichtbare Unterschiede (Abb. 19). Die höchste ATP-Bildungsrate war erwartungsgemäß bei dem Abbau der Glucose über den Embden-Meyerhof-Parnas Weg zu beobachten. Da im MGO-Nebenweg keine Substratkettenphosphorylierung stattfindet und es zur Reduktion eines Flavoproteins anstelle von NAD kam (Tab. 2), lag die ATP-Bildungsrate deutlich niedriger. Die Nutzung des Methylglyoxal-Nebenwegs bedeutet für die Bakterien eine sehr viel niedrigere Energieausbeute. Daher ist der Abbau der Glucose über diesen Stoffwechselweg nur unter Bedingungen sinnvoll, bei denen der Energiebedarf der Zelle gedeckt ist und das Bereitstellen von Intermediaten für die Biomassebildung im Vordergrund steht. Unter der Voraussetzung, daß der Pentosephosphat Weg durchlaufen wird, kam es ebenfalls zu einer Reduktion der ATP-Bildungsrate. Der Pentosephosphat Weg wird von den Zellen genutzt, um Monomere für die Synthese von Nucleinsäuren und anderen Biopolymeren zu erhalten, so daß hier die Energiegewinnung im Hintergrund steht. Die unterschiedlichen Stoffwechselwege geben den Bakterien die Möglichkeit, sich auf verschiedenen Bedingungen einzustellen. Bei einer Energiequellen-Limitierung können die Abbauwege mit der höchsten Energieausbeute verwendet werden, während bei einer Kohlenstoffquellen-Limitierung alternative Nebenwege (z.B. MGO-Nebenweg) genutzt werden können, die mit einer deutlich niedrigeren Energieausbeute wichtige Monomere für die Biopolymersynthese zur Verfügung stellen. Dadurch erhält *Escherichia coli* die notwendige Flexibilität, sich besser an äußere Bedingungen anzupassen.

4.1.7.2 Adenylatnucleotide

Die größte Schwierigkeit bei der Bestimmung des Adenylate Energy Charges (AEC) bildete die Poolstabilität. Die Erneuerung des ATP-Pools geht in vivo sehr schnell, so daß ein schnelles Abstoppen des Stoffwechsels von Nöten war, um eine möglichst genaue Bestimmung der Nucleotide zu gewährleisten. Die Zeit, die *Escherichia coli* zur Umsetzung des Pools benötigt (turnover rate), wird in der Literatur sehr unterschiedlich angegeben. Nach Holms et al. (1972) erneuert *E.coli* mit einer Verdoppelungszeit von 45 min den Pool fünf mal pro Sekunde, während Chapman und Atkinson (1977) für *Escherichia coli* angeben, daß bei einer Verdoppelungszeit von 40 min alle 80 Sekunden und bei $t_d = 110$ min alle 210 Sekunden der Pool erneuert wird. Harrison und Maitra (1969) zeigten bei *Aerobacter aerogenes*, daß die

Umsatzrate abhängig von der Wachstumsrate ist. Ihre Ergebnisse lagen mit einer Rate von vier mal pro Sekunde bei Wachstum auf Glucose und einer Verdoppelungszeit von 45 min im Bereich der Ergebnisse von Holms et al. (1972).

Die ATP-Konzentration für *E. coli* TG1 fiel mit steigender Durchflußrate von $4,5 \mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ auf $2 \mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ mit (Abb. 20), während die spezifische sauerstoffbezogene ATP-Bildungsrate von $7,9 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ auf $35 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ stieg (Abb. 19), so daß der Umsatz bei niedrigen Durchflußraten alle zwei Sekunden stattfand und mit steigender Verdünnungsrate auf bis zu vier mal pro Sekunde anstieg. Damit lagen die gewonnenen Ergebnisse für *E. coli* TG1 in der Größenordnung der Ergebnisse von Harrison und Maitra (1969) und Holms et al. (1972) und bestätigten die Wachstumsabhängigkeit des Umsatzes.

Die ATP-Konzentration wird in der Literatur mit $3 - 9 \mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ (Holms et al., 1972; Kahru et al., 1987; Kahru und Vilu, 1990) angegeben, d.h. die in dieser Arbeit ermittelten Werte lagen im unteren Bereich der sonst gemessenen Werte.

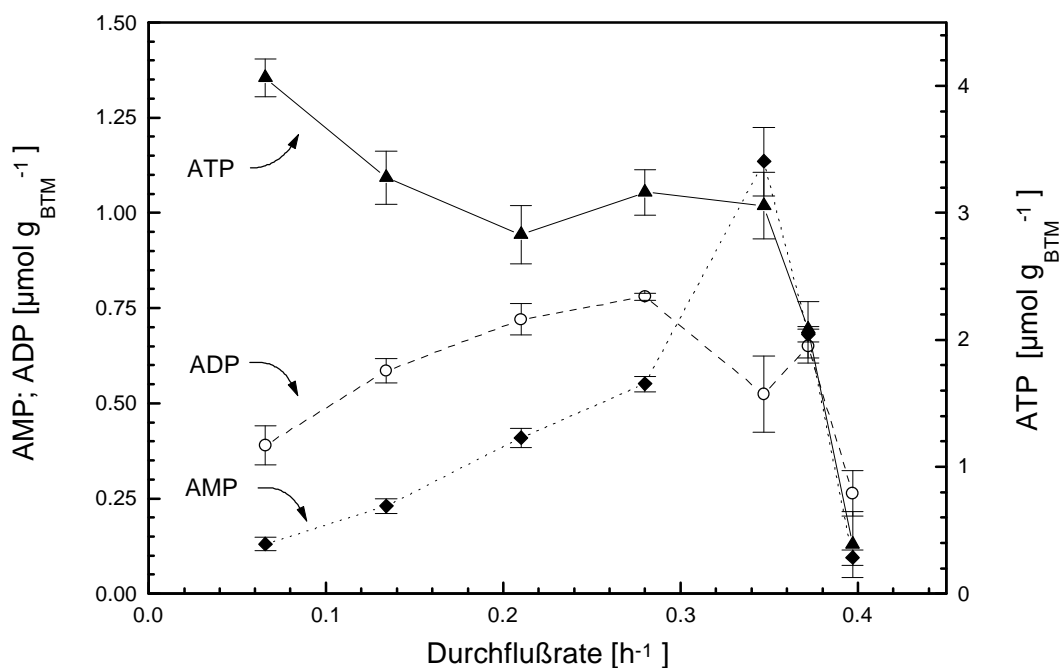


Figure 20: Adenosinnucleotidkonzentrationen bei *Escherichia coli* TG1

4.1.7.3 AEC

Der AEC liegt im allgemeinen bei wachsenden Bakterien über 0,7, so listet Knowles (1977) Werte von 0,7 - 0,94 für verschiedene *E. coli* K12 Stämme auf. Der AEC fiel bei der kontinuierlichen Kultivierung von *Escherichia coli* TG1 mit steigender Durchflußrate von 0,93 auf 0,7 (Abb. 21), d.h bei niedrigen Durchflußraten war der Energiegehalt der Zelle höher. Betrachtet man den Verlauf der einzelnen Adenosinnucleotide, so zeigt sich, daß der ATP-Gehalt mit steigender Durchflußrate sank, während die AMP-Konzentration stieg (Abb. 20).

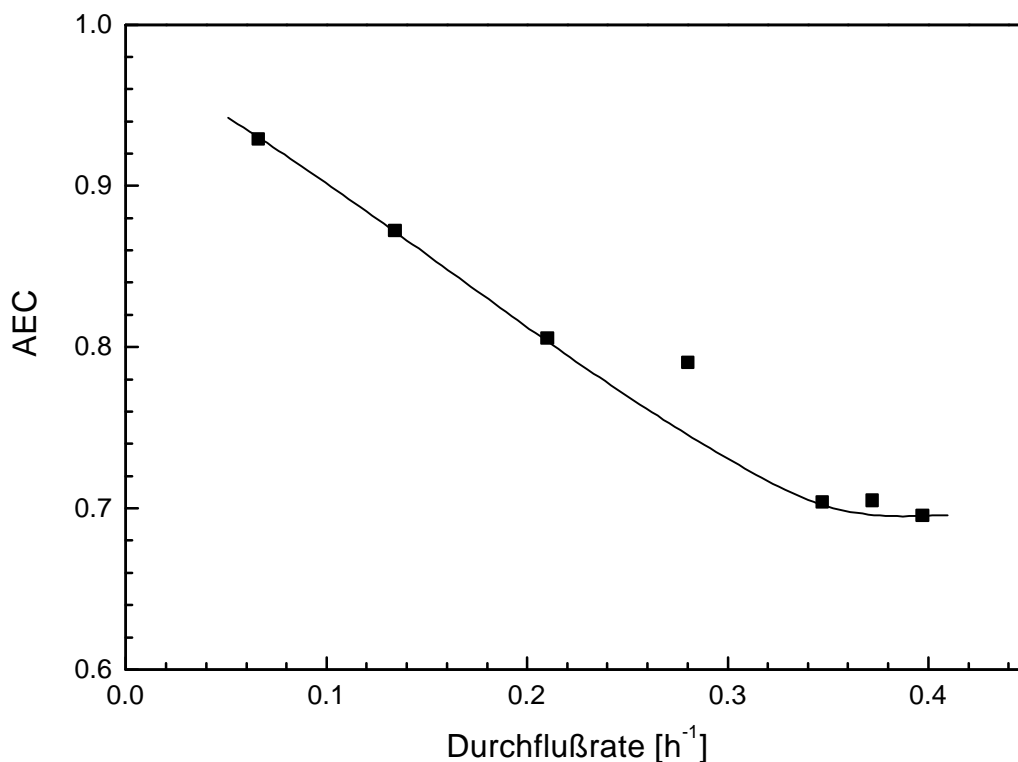


Abbildung 21: AEC von *Escherichia coli* TG1 im Chemostaten

Die Beobachtung des fallenden AECs mit steigender Wachstumsrate wurde durch die Ergebnisse einer satzweisen Kultivierung unterstützt. Zu Beginn der kontinuierlichen Kultivierung erfolgte zur Anzucht der Bakterien immer eine Satzkultivierung. Bei einer dieser Satzkultivierungen erfolgte eine Überprüfung des Energiegehalts der Bakterien. Da anfänglich die Bakteriendichte

zu gering war, konnte erst nach einigen Stunden mit der Bestimmung begonnen werden. Die Abbildung 22 zeigt, daß während der exponentiellen Wachstumsphase ein sehr niedriger AEC vorlag, der erst anstieg, als sich das Wachstum verlangsamte und in die stationäre Phase übergang. Die Werte können nicht direkt mit dem Chemostaten verglichen werden, da in der exponentiellen Phase Glucose im Überschuß vorlag, während bei der kontinuierlichen Kultivierung eine Limitierung dieses Substrats vorhanden war. Trotzdem bleibt die vergleichbare Tendenz, daß der AEC bei schnellem Wachstum niedrig war, während er mit abnehmender Wachstumsrate stieg.

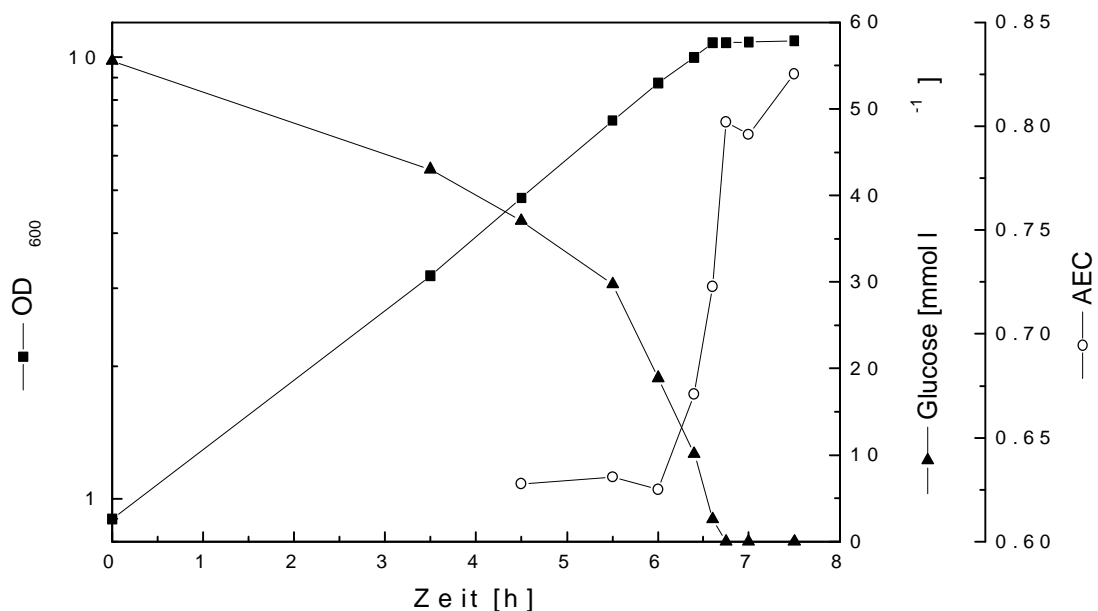


Abbildung 22: AEC bei der satzweisen Kultivierung von *Escherichia coli* TG1

Mit steigender Verdünnungsrate nahm der aufgenommene Sauerstoff pro metabolisierter Glucose aufgrund der sinkenden Dissimilation ab, wodurch es zu einer niedrigeren ATP-Bildungsrate pro aufgenommener Glucose kam. Gleichzeitig nahm die Biomassebildung mit steigender Durchflußrate zu, so daß mehr ATP im Anabolismus verbraucht wurde. Dies beides bedingte ein Absinken des ATP-Spiegels in der Zelle und damit einen niedrigeren AEC.

4.1.8 Glucoselimitierung im Chemostaten

Die aufgezeigten Veränderungen während der kontinuierlichen Kultivierung bei hohen Durchflußraten deuteten auf einen Wandel im Stoffwechsel hin. Die Erklärung hierfür müßte sich im Glucosestoffwechsel finden, da Glucose das einzige limitierte Substrat war, während die anderen Substrate alle im Überschuß vorlagen. Der Glucose kam eine bivalente Aufgabe zu, da sie *E. coli* nicht nur als einzige Kohlenstoffquelle, sondern ebenfalls als einzige Energiequelle diente (Abb. 1). Dadurch sind verschieden Arten der Limitierung möglich: eine C-Quellen- und eine Energielimitierung.

Bei niedrigen Durchflußraten war eine geringere Biomassebildung zu beobachten und gleichzeitig wurde ein hoher AEC gemessen, der anzeigte, daß der Energiegehalt der Zellen hoch war. Dadurch liegt die Vermutung nah, daß bei niedrigen Durchflußraten eine C-Quellen-Limitierung vorlag, d.h. es konnten nicht genug Intermediate aus dem Katabolismus abgezogen werden und für die Biomassesynthese bereitgestellt werden. Eine mögliche Alternative zur Glycolyse wäre dann der Methylglyoxal-Nebenweg, der die Bereitstellung von Pyruvat mit einer geringeren Energieausbeute gewährleistet. Eine hohe Aktivität dieses Stoffwechselweges bei niedrigen Wachstumsraten konnten Teixeira de Mattos et al. (1984) schon bei *Klebsiella aerogenes* unter anaeroben Bedingungen beobachten.

Mit steigender Durchflußrate änderte sich die Art der Limitierung, was sich in einer höheren Biomassebildung und einem niedrigen AEC zeigte. Die Bakterien hatten nun genügend Kohlenstoff zur Verfügung, um verstärkt Biomasse bilden zu können. Die anabolen, energieverbrauchenden Reaktionen bedingten einen niedrigeren AEC, der auf eine Energielimitierung hindeutet. In diesem Fall wäre die Nutzung des Methylglyoxal-Nebenwegs ungünstig, da die Energieausbeute gesenkt würde. Dafür kam es zur verstärkten Nutzung des Pentosephosphatwegs, da durch ihn wichtige Metabolite für den Anabolismus und außerdem NADPH₂, was für die Reduktionsreaktionen im Anabolismus unerlässlich ist zur Verfügung gestellt werden.

Ein weiteres Indiz für eine Verschiebung im Stoffwechsel war die Essigsäurebildung. So zeigten Han et al. (1992), daß Acetat als Folge einer Umorganisation im Stoffwechsel gebildet wird. Bei dieser Umorganisation werden die anabolen Bedürfnisse der Organismen in den Vordergrund gestellt und eine niedrigere ATP-Ausbeute in Kauf genommen.

4.1.9 Stoffflußmodellierung

Durch Vereinfachung der biochemischen Reaktionen von *Escherichia coli* entstand ein Modell, das 28 Reaktionen umfaßt, an denen 31 Metabolite beteiligt sind. Die einzelnen Reaktionen wurden mit R1 - R28 bezeichnet, wobei später eine weiteres Zusammenfassen von einigen Reaktionen (R9-R10; R11-R14; R22-R23) erfolgte, da die Flüsse durch diese Stoffwechselwege gleich waren (s. Anhang).

Mit Hilfe dieses entwickelten Modells und den gemessenen Stoffwechselraten konnten die intrazellulären Flüsse berechnet werden. Die Konditionsnummer der Matrix lag bei $C(\mathbf{A}) = 47$, also deutlich unter 100, so daß das System als gut konditioniert zu betrachten war (Vallino und Stephanopoulos, 1990). Die Stoffflüsse wurden auf die Glucoseaufnahme normiert, die auf 100 gesetzt wurde, so daß alle anderen Werte sich auf $100 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ aufgenommene Glucose beziehen.

In Abbildung 24 ist das stöchiometrische Modell des Bakterienstoffwechsels dargestellt mit den berechneten Stoffflüssen für eine niedrige Durchflußrate ($D = 0,066 \text{ h}^{-1}$) und eine höhere Durchflußrate ($D = 0,28 \text{ h}^{-1}$). Bei niedrigen Durchflußraten liegt der Anteil der Glucose, welcher in den Pentose-Phosphat-Weg einfloß (R19), mit 35-40 % etwas über den ansonsten für *E. coli* angegebenen Wert (Gottschalk, 1978). Durch die steigende Biomassebildungsrate mit steigender Durchflußrate wurden mehr NADPH_2 und mehr Intermediate für die Biomassesynthese benötigt, so daß der Stofffluß durch den Pentose-Phosphat-Weg noch deutlich anstieg. Gleichzeitig sank der Fluß durch den Embden-Meyerhof-Parnas Weg und den nachfolgenden Tricarbonsäure-Zyklus deutlich ab. Der verringerte Fluß durch den TCC bedingte eine niedrigere NADH_2 -Bildungsrate, so daß die Oxidation der Reduktionsäquivalente in der Atmungskette zur Regenerierung von ATP sank. Dies wurde durch den erhöhten Bedarf an NADPH_2 in der Biosynthese noch verstärkt. Durch die höhere Biomassebildungsrate nahm der Bedarf an Stickstoff zu, so daß der Fluß durch die Reaktionen R16-R18, die an der Stickstoffaufnahme beteiligt sind, ebenfalls zunahm. Die Stoffflüsse, die zur Synthese der Biomasse benötigt wurden (R27), nahmen mit steigender Durchflußrate zu und damit ging eine Abnahme der Stoffflüsse durch die katabolischen Reaktionen einher. Der Fluß durch die einbezogene anaplerotische Reaktion R7 - die Carboxylierung des PEP - blieb hingegen über den gesamten Wachstumsbereich konstant

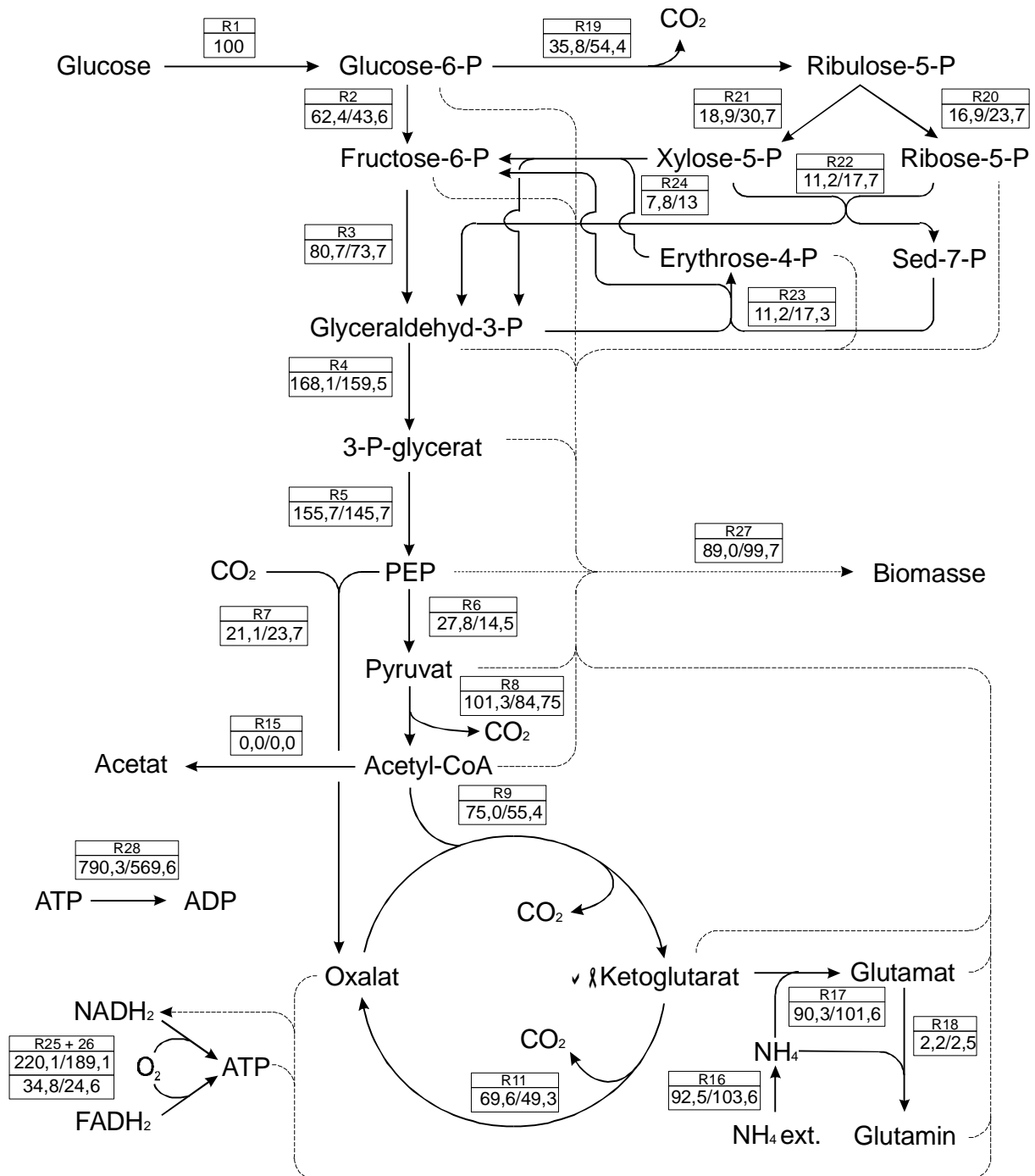


Abbildung 23: Verteilung der intrazellulären Stoffflüsse bei *Escherichia coli* TG1. Die Stoffflüsse sind auf die Glucoseaufnahme normiert. Die Reaktionsnummer steht in der ersten Reihe, in der zweiten steht erst der Stofffluß bei $D = 0,066 \text{ h}^{-1}$ und dann bei $D = 0,28 \text{ h}^{-1}$

In Reaktion R28 wird der Teil des ATPs dargestellt, der für die Erhaltung der Zelle benötigt wurde. Dies ist keine einzelne Reaktion, sondern setzt sich aus dem Verbrauch des ATPs für die Aufrechterhaltung des pHs, den Abbau durch futile cycles oder durch ATPase und andere ATP verbrauchende Prozesse, die nicht unmittelbar mit der Biomassebildung verknüpft sind, zusammen. Der Stofffluß durch diese ATP-verbrauchenden Reaktionen (R28) nahm mit steigender Durchflußrate deutlich ab, d.h. der benötigte Maintenance Bedarf hat bei hohen Durchflußraten einen geringeren Einfluß als bei niedrigen. Dies stimmt mit den Ergebnissen des berechneten Erhaltungsbedarfs aus der Glucoseaufnahmerate nach Neijssel und Tempest (1976) überein (s. 4.1.5).

Mit mathematischen Modellen können parallel-verlaufende Stoffwechselwege nur unterschieden werden, wenn ein oder mehrere Intermediate dieser Stoffwechselwege detektiert werden können. Da im Fließgleichgewicht weder Intermediate des Methylglyoxalnebenweges noch des Abbaus des DHAP über den Embden-Meyerhof-Parnas Weg nachweisbar waren, konnten die Berechnungen mit diesem Modell keinen Aufschluß darüber geben, ob der MGO-Nebenweg genutzt wurde.

Anfänglich wurden alle gemessenen Stoffwechselraten genutzt, um die Konsistenz der Messung zu überprüfen, später wurde das Flußdiagramm nur aus Biomasse, Glucose und Acetat berechnet. Diese Reduktion des Modells war möglich, da drei Metabolite mehr im Modell enthalten waren als beteiligte Reaktionen ($m > n$). Die Voraussetzung zur Lösung der Matrix lautete aber nur, daß die Anzahl größer oder gleich ist ($m \geq n$), so daß drei Stoffwechselraten - CO_2 ; O_2 ; NH_3 - aus dem System genommen werden konnten.

Beim Vergleich der Stoffflüsse, die unter Verwendung aller gemessenen Stoffwechselraten ermittelt wurden und denen, die nur mit Hilfe der Glucoseverbrauchs-, Biomassebildungs- und Essigsäurebildungsrate berechnet wurden, zeigte sich, daß die Unterschiede nur relativ gering waren. Der größte Unterschied lag in der Biomassebildung und der Beteiligung des Pentosephosphatwegs am Abbau der Glucose. In Tabelle 6 sind zum Vergleich exemplarisch die berechneten Stoffflüsse nach beiden Methoden bei $D = 0,066 \text{ h}^{-1}$ aufgelistet.

Tabelle 6: Intrazelluläre Stoffflüsse [$\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$] bei *Escherichia coli* im Chemostaten unter aeroben, glucoselimitierten Bedingungen bei einer Durchflußrate von $D = 0,066 \text{ h}^{-1}$; Die mittlere Spalte (3 Par.) gibt die Stoffflüsse wieder, die mit Hilfe der drei Parameter -Wachstumsrate, Acetatbildungsrate und Glucoseaufnahmerate - berechnet wurden, während die Werte der letzten Spalte (alle Par.) aus allen gemessenen Stoffwechselraten ermittelt wurden

D [h^{-1}]	0,066	0,066	D [h^{-1}]	0,066	0,066
Reaktion	3 Par.	alle Par.	Reaktion	3 Par.	alle Par.
R(1)	0,73	0,69	R(18)	0,016	0,015
R(2)	0,456	0,479	R(19)	0,261	0,199
R(3)	0,589	0,575	R(20)	0,123	0,099
R(4)	1,22	1,182	R(21)	0,138	0,1
R(5)	1,137	1,1	R(22-23)	0,0819	0,0614
R(6)	0,2	0,22	R(24)	0,0568	0,039
R(7)	0,15	0,139	R(25)	1,607	1,599
R(8)	0,739	0,74	R(26)	0,254	0,266
R(9-10)	0,548	0,568	R(27)	0,65	0,588
R(11-14)	0,508	0,532	R(28)	5,77	6,018
R(15)	0	0	q_{NH_3}	0,52	0,68
R(16)	0,675	0,61	q_{O_2}	1,9	1,86
R(17)	0,659	0,595	q_{CO_2}	1,98	1,9

Aus den mit Hilfe der Glucoseaufnahme-, der Biomassebildungs- und der Essigsäurebildungsrate kalkulierten Stoffflüssen konnten die fehlenden Stoffwechselraten - für CO_2 ; O_2 ; NH_3 - berechnet werden und mit den gemessenen Raten verglichen werden.

Bei niedrigen Wachstumsraten im Chemostaten unter aeroben, glucoselimitierten Bedingungen konnten die Stoffflüsse und daraus dann die Stoffwechselraten mit Hilfe weniger, einfacher Messungen berechnet werden. Da sich die Biomasse aus der Wachstumsrate bei Festlegung der

Molmasse von *E. coli* auf 100 g mol^{-1} (Weber, 1997) berechnen ließ, war nur die Messung der Glucoseaufnahme und der Acetatbildung notwendig, um die Stoffwechselraten für Stickstoff, Sauerstoff und Kohlendioxid mit zufriedenstellender Genauigkeit zu ermitteln. In Abbildung 24 sind zum Vergleich die berechneten und gemessenen Kohlendioxidbildungs- und Sauerstoffaufnahme-raten aufgetragen. Die Abweichung der berechneten Daten nahm mit steigender Verdünnungsrate zu, zeigten aber auch im oberen Durchflußratenbereich maximal eine Abweichung von 12%.

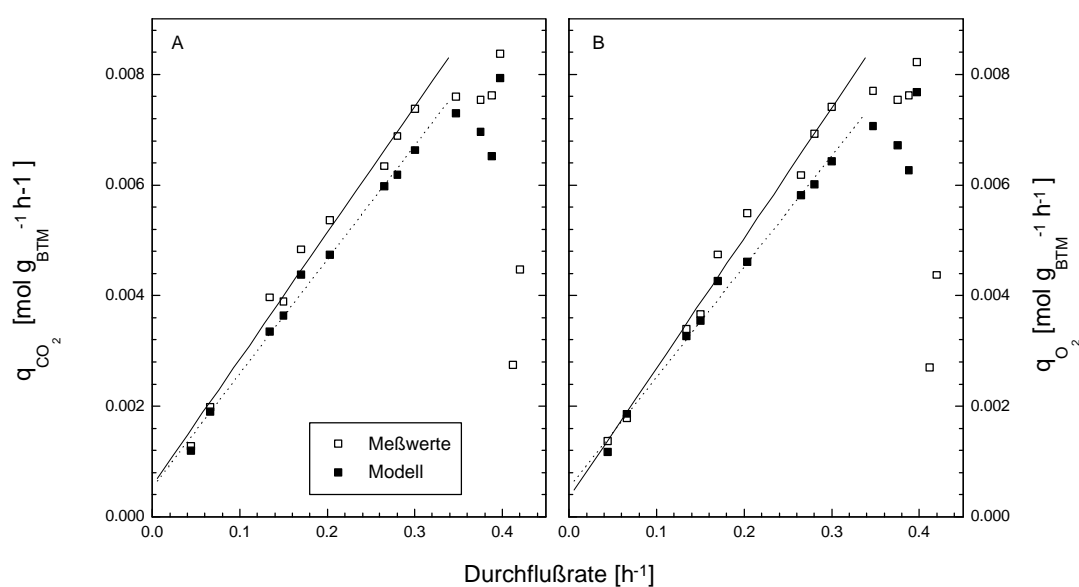


Abbildung 24: Vergleich der gemessenen und der berechneten Sauerstoffaufnahme-raten (B) und Kohlendioxidbildungsrate (A) bei *Escherichia coli* TG1

4.2 Dynamische Zustände im Chemostaten

4.2.1. Veränderungen der Durchflußrate

Um die physiologischen Möglichkeiten der Bakterien genauer zu untersuchen, wurden dynamische Versuche durchgeführt. Dazu wurde das System direkt nach Veränderung der Durchflußrate beobachtet, indem in den ersten zwei Minuten die Probenahme im Sekundenbereich (alle 15 s) und später dann im Minuten bzw. Stundenbereich erfolgte. Die Versuche starteten bzw. endeten immer bei $D = 0,066 \text{ h}^{-1}$ als niedrige Durchflußrate, um ein Vergleichen der Ergebnisse zu erleichtern. Die entnommenen Proben wurden auf Glucose, organische Säuren und Adenosinnucleotide untersucht.

Damit das Probevolumen im Verhältnis zum Reaktorvolumen nicht zu groß wurde, konnten nur Einfachproben entnommen werden. Um eine größere Probenanzahl zu erhalten, kam es zur mehrfachen Wiederholung der Versuche. Bei einigen Versuchen erfolgte auch eine genaue Bestimmung der Zellzahl und -größe, die beide keinen Änderungen unterlagen.

4.2.1.1 Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxidbildung

Nach Änderung der Durchflußrate war eine sofortige Reaktion des Stoffwechsels der Bakterien zu erkennen, da sich sowohl die Sauerstoffaufnahme als auch die Kohlendioxidbildungsrate änderten. So kam es bei Erhöhung des Zuflusses sofort durch eine verstärkte Atmungsaktivität zu einer höheren Sauerstoffaufnahme und einer erhöhten Kohlendioxidbildungsrate (Abb. 25). Die erste spontane Reaktion endete nach ca. 10 min in einem Überspringen, d.h. die Werte sanken ein wenig, bevor Sie erneut anstiegen, bis nach einigen Stunden der neue Fließgleichgewichtszustand erreicht wurde. Das umgekehrte Bild zeigte sich beim Herabsetzen der Durchflußrate: es kam dort zu einem spontanen Sinken der Sauerstoffaufnahme und der Kohlendioxidbildungsrate, einem kurzen Anstieg und dem anschließend langsamen Anpassen an die neuen Konditionen.

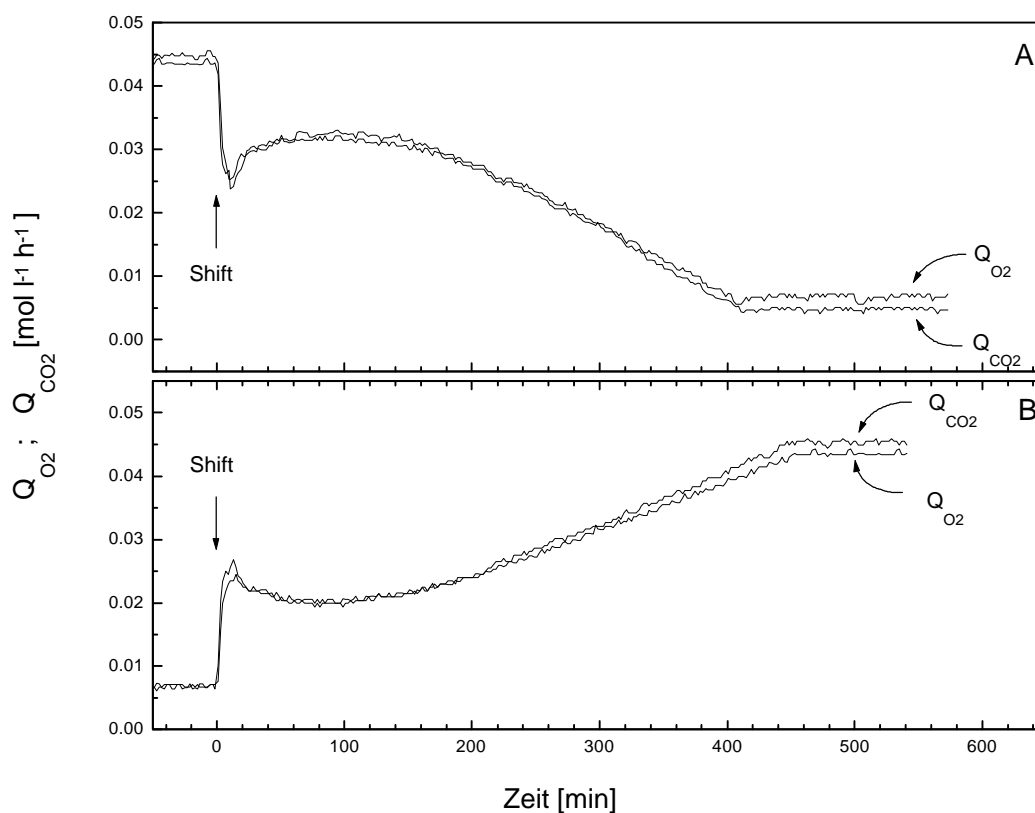


Abbildung 25: Sauerstoffaufnahme- und Kohlendioxidbildungsrate nach Veränderung der Durchflußrate bei *Escherichia coli* TG1; (A) Herabsetzen von $D = 0,23\ h^{-1}$ auf $D = 0,066\ h^{-1}$; (B) Erhöhung von $D = 0,066\ h^{-1}$ auf $D = 0,23\ h^{-1}$

4.2.1.2 Glucose und organische Säuren

Bei der Reduktion des Zuflusses konnten keine organischen Säuren oder Glucose im Medium detektiert werden, aber beim Erhöhen waren sowohl Glucose als auch Lactat und Acetat nachzuweisen.

Das Heraufsetzen der Durchflußrate bedeutete erst einmal ein erhöhtes Substratangebot, bis sich die Bakterien mit ihrem Wachstum an die neuen Bedingungen angepaßt hatten. Die zusätzliche Glucose konnte anfänglich nicht vollständig genutzt werden, so daß kurz nach der Zuflußerhöhung Glucose im Medium nachzuweisen war (Abb. 26). Erst nach einigen Stunden kam es zu einer Abnahme der Glucosekonzentration im Medium, bis dann im Fließgleichgewicht die Glucose wieder vollständig metabolisiert wurde.

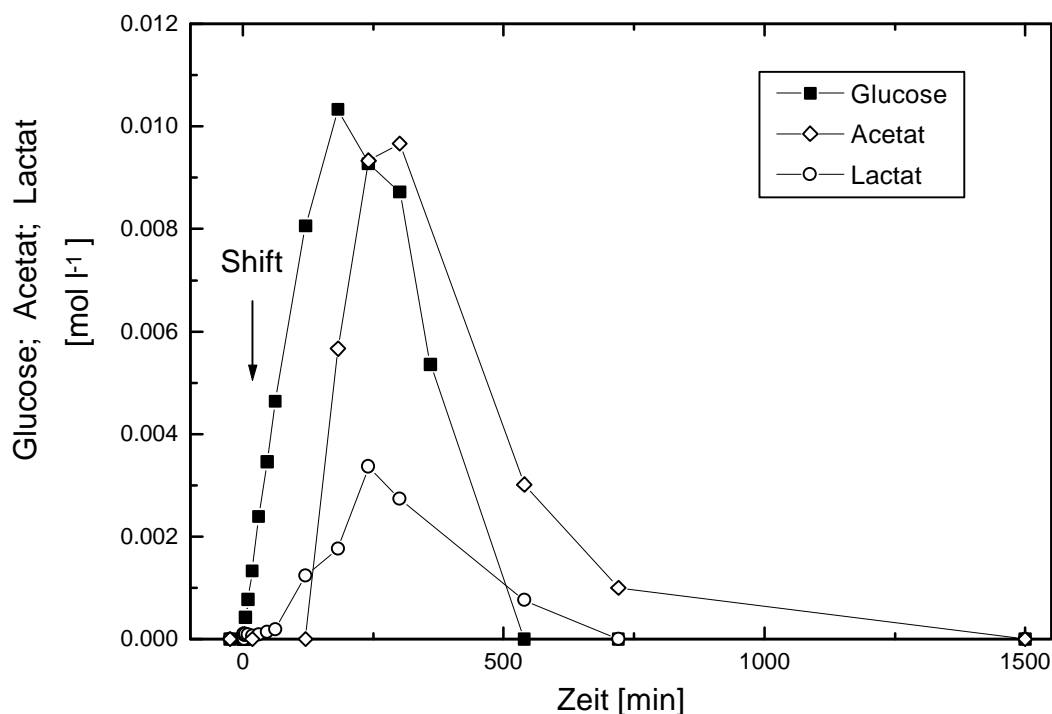


Abbildung 26: Akkumulation von Glucose und organischen Säuren nach Erhöhung der Durchflußrate von $D = 0,066 \text{ h}^{-1}$ auf $D = 0,23 \text{ h}^{-1}$

Dadurch kam es zu neuen Konditionen im System, denn die sonst limitierende C-Quelle lag für einige Zeit im Überschuß vor. Ein Substratüberschuß bedingt häufig die Ausscheidung organischer Säuren (El-Mansi und Holms, 1989), so daß es kurz nach dem Auftreten von Glucose im Kulturüberstand zur Akkumulation von Acetat und Lactat kam. Wie schon erwähnt, ist Essigsäure ein häufig beobachtetes Intermediat, daß von *E. coli* unter Substratüberschuß gebildet wird (Han et al., 1992). Lactat kann aus Pyruvat gebildet werden und somit unter anderem der Oxidation von Reduktionsäquivalenten dienen, um das richtige Redox-Milieu in der Zelle aufrechtzuerhalten (Teixeira de Mattos und Neijssel, 1997). Eine weitere Quelle für das Lactat ist der Methylglyoxal-Nebenweg, da beim Abbau des Methylglyoxals Lactat entsteht (Cooper, 1984).

4.2.1.3 Methylglyoxal

Kurze Zeit nach Erhöhung der Durchflußrate konnte eine Akkumulation von Methylglyoxal (MGO) im Medium beobachtet werden. Das MGO erreichte bei kleinen Sprüngen nur ein relativ niedriges Niveau und nach einiger Zeit wurde das MGO wieder ausgewaschen, bis nach wenigen Stunden kein Methylglyoxal mehr nachzuweisen war (Abb. 27).

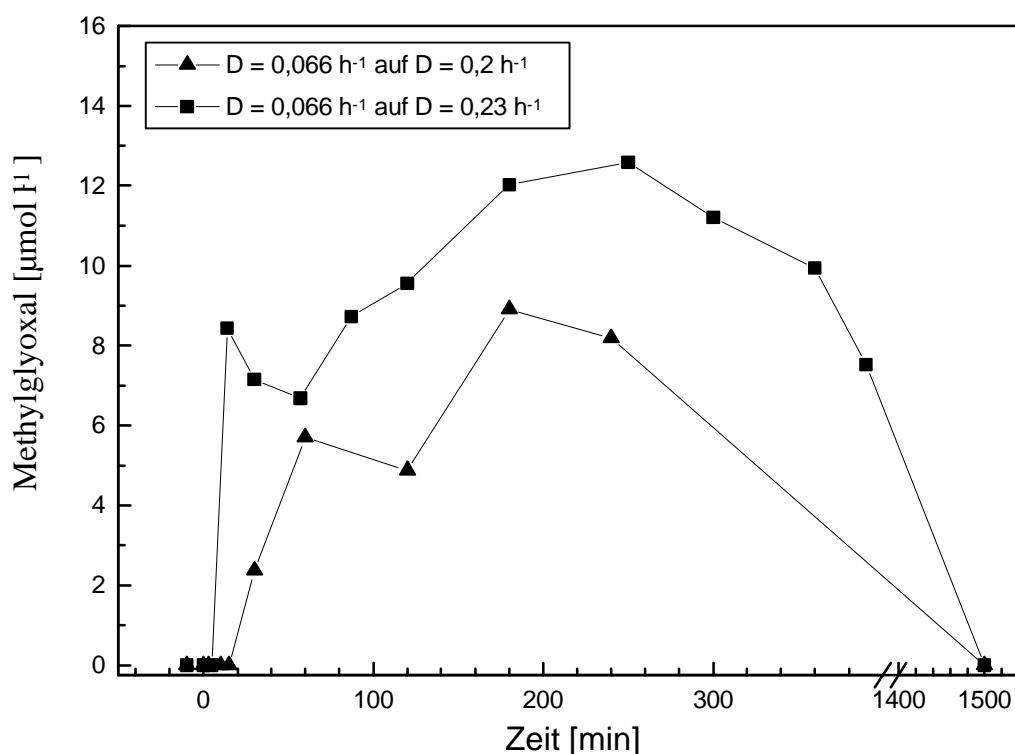


Figure 27: Akkumulation von Methylglyoxal bei *Escherichia coli* TG1 nach Erhöhung der Durchflußrate von $D = 0,066 \text{ h}^{-1}$ auf $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$ bzw. $D = 0,23 \text{ h}^{-1}$

Methylglyoxal kann in mehreren Reaktionswegen gebildet werden, wobei die Hauptquelle der Methylglyoxal-Nebenweg ist. Dihydroxyacetonphosphat kann durch verschiedene Enzyme zu MGO reagieren (Inoue und Kimura, 1995), allerdings wurde für *E. coli* nur die Methylglyoxal-Synthase nachgewiesen (Hopper und Cooper, 1972). Bei prokaryontischen Zellen wurde der Abbau von L-Threonine über Acetonphosphat zu Methylglyoxal beobachtet (Inoue und Kimura, 1995). Bei Zellen, die in Gegenwart von Aceton wachsen, konnte die Bildung von Methylglyoxal aus Aminoaceton

beobachtet werden (Cooper, 1984). Bei den durchgeführten Versuchen stellte der Methylglyoxal-Nebenweg die einzige Quelle für das akkumulierte MGO dar. Die Aktivität des MGO-Nebenweges bei niedrigen Wachstumsraten wurde schon bei *Klebsiella aerogenes* unter anaeroben Bedingungen nachgewiesen (Teixeira de Mattos et al., 1984). Bei *E. coli* wurde bisher hingegen die Akkumulation von MGO nur beobachtet, wenn die Kohlenstoffaufnahme deutlich schneller erfolgte als der Abbau des Glucose-6-phosphats. Dieses kann unter anderem dann passieren, wenn die Organismen an eine niedrige Glucosekonzentration adaptiert sind und plötzlich ein Überschuß vorliegt (Töttemeyer et al., 1998). Bei den durchgeführten Versuchen war *E. coli* TG1 an niedrige Substratkonzentration angepaßt und die Erhöhung der Durchflußrate bewirkte einen Glucoseüberschuß (s. 4.2.2). Als Folge spielte sich die Glucoseaufnahme zu schnell ab und es kam zu einem Überschuß an Glucosephosphat in der Zelle. Hohe Zuckerphosphatkonzentration und dadurch bedingt niedrige Konzentration an anionischen Phosphat aktivieren die Methylglyoxalsynthase (Cooper, 1984; Töttemeyer et al., 1998). Die Anwesenheit von cAMP, das auch bei der Erhöhung der Durchflußrate in niedrigen Mengen ausgeschieden wurde (Abb. 30A), fördert ebenfalls die Überproduktion von Methylglyoxal (Ackermann et al., 1974).

Der MGO-Nebenweg war bei niedrigen Durchflußraten aktiv, so daß die Erhöhung des Zuflusses zu einer verstärkten Produktion an Methylglyoxal führte. Der Abbau des MGOs erfolgte dann nicht schnell genug, so daß es zu einer Akkumulation kam. Die neuen Konditionen, die durch die Erhöhung des Zuflusses geschaffen wurden - Substratüberangebot, Anwesenheit von cAMP - verstärkten die Bildung des Methylglyoxals noch zusätzlich. Unter diesen Bedingungen war der Abbau des Methylglyoxals anscheinend der geschwindigkeitsbestimmende Schritt dieses Nebenweges, so daß es zu einem deutlichen Anstieg der MGO-Konzentration kam.

4.2.2 Energiestoffwechsel

Die ATP-Bildungsrate ist direkt abhängig von der Sauerstoffaufnahme (Gleichung 2.18), da der größte Teil des ATPs in der Atmungskette entsteht. Die Sauerstoffaufnahme reagierte spontan auf die Änderung der Durchflußrate, so daß sich als Folge auch die ATP-Bildungsrate änderte. Das Heraufsetzen bewirkte einen sprunghaften Anstieg der ATP-Bildungsrate, der in einem Überschwingen endete, bevor die Bildungsrate dann wieder langsam auf den Endwert anstieg.

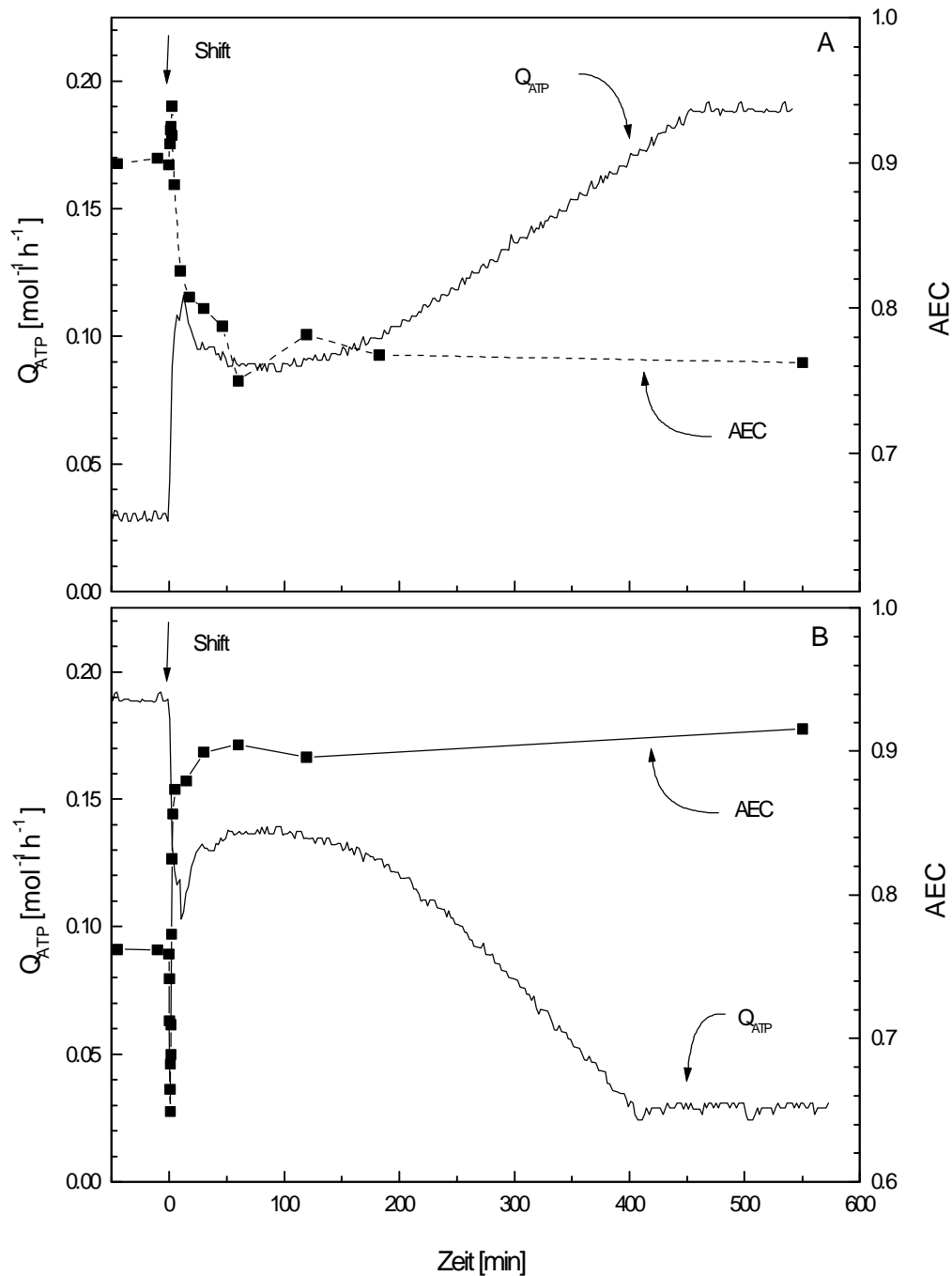


Abbildung 28: Sauerstoffaufnahme und AEC von *Escherichia coli* TG1 nach Veränderung der Durchflußrate; (A) nach Erhöhen von $D = 0,066 \text{ h}^{-1}$ auf $D = 0,23 \text{ h}^{-1}$; (B) nach Reduktion von $D = 0,23 \text{ h}^{-1}$ auf $D = 0,066 \text{ h}^{-1}$

(Abb. 28A). Bei der Reduktion der Verdünnungsrate zeigte sich der gleiche Verlauf, nur umgekehrt (Abb. 28B).

Die ATP-Bildungsrate hatte Einfluß auf den Energiegehalt der Zelle, so daß der AEC ebenfalls eine sofortige Reaktion auf die Änderung der Durchflußrate zeigte. Das Herabsetzen der Flußrate bewirkte eine Verringerung des ATP-Spiegels, während die AMP- und ADP-Konzentration einen leichten Anstieg zeigten (Abb. 29B). Durch das plötzlich verringerte Glucoseangebot kam es zu einer Hungerreaktion, so daß sich die ATP-Bildungsrate sofort verringerte, während die ATP-verbrauchenden Prozesse anfänglich auf dem hohen Niveau weiterliefen. Das dadurch bedingte Sinken der ATP-Konzentration hatte eine Reduktion des AECs zur Folge.

Als Reaktion auf das verringerte Glucoseangebot kam es zur Bildung von cAMP, welches ein ubiquitäres Hungersignal und einen Botenstoff darstellt (Pastan und Adhya, 1976). cAMP lag sowohl intra- als auch extrazellulär vor, da die Ausscheidung von cAMP linear abhängig ist von der intrazellulären Konzentration (Epstein et al., 1975). Durch die Stimulierung der Initiation der Transkription vieler induzierbarer Operons durch cAMP wird die Synthese verschiedener kataboler Enzyme aktiviert, die den Abbau alternativer C-Quellen ermöglicht (Pastnak und Adhya, 1976). Eine weitere Aufgabe des cAMPs stellt die Aktivierung von Glucoseaufnahmesystemen mit höherer Substrataffinität dar (Ullmann und Danchin, 1983; Ferenci, 1996).

Direkt nach Erhöhen des Zuflusses sank die ADP- und die AMP-Konzentration, während der ATP-Spiegel anstieg (Abb. 29A), so daß es zu einer Vergrößerung des AECs kam, der aber nach kurzer Zeit wieder abnahm und langsam auf den Endwert fiel. Da die Feinregulation des Stoffwechsels eine gewisse Zeit in Anspruch nahm und die Bakterien an sehr geringe Glucosekonzentrationen angepaßt waren, kam es anfänglich durch das höhere Substratangebot zu einem sehr schnellen Glucoseabbau. Dadurch kam es zu einer verstärkten Bildung von Reduktionsäquivalenten, so daß in der Atmungskette mehr ATP produziert werden konnte, was wiederum den anfänglichen Anstieg des AECs erklärte. Nachdem die Zellen anfangen schneller zu wachsen, also die ATP-verbrauchenden Stoffwechselwege verstärkt genutzt wurden, sank der AEC wieder

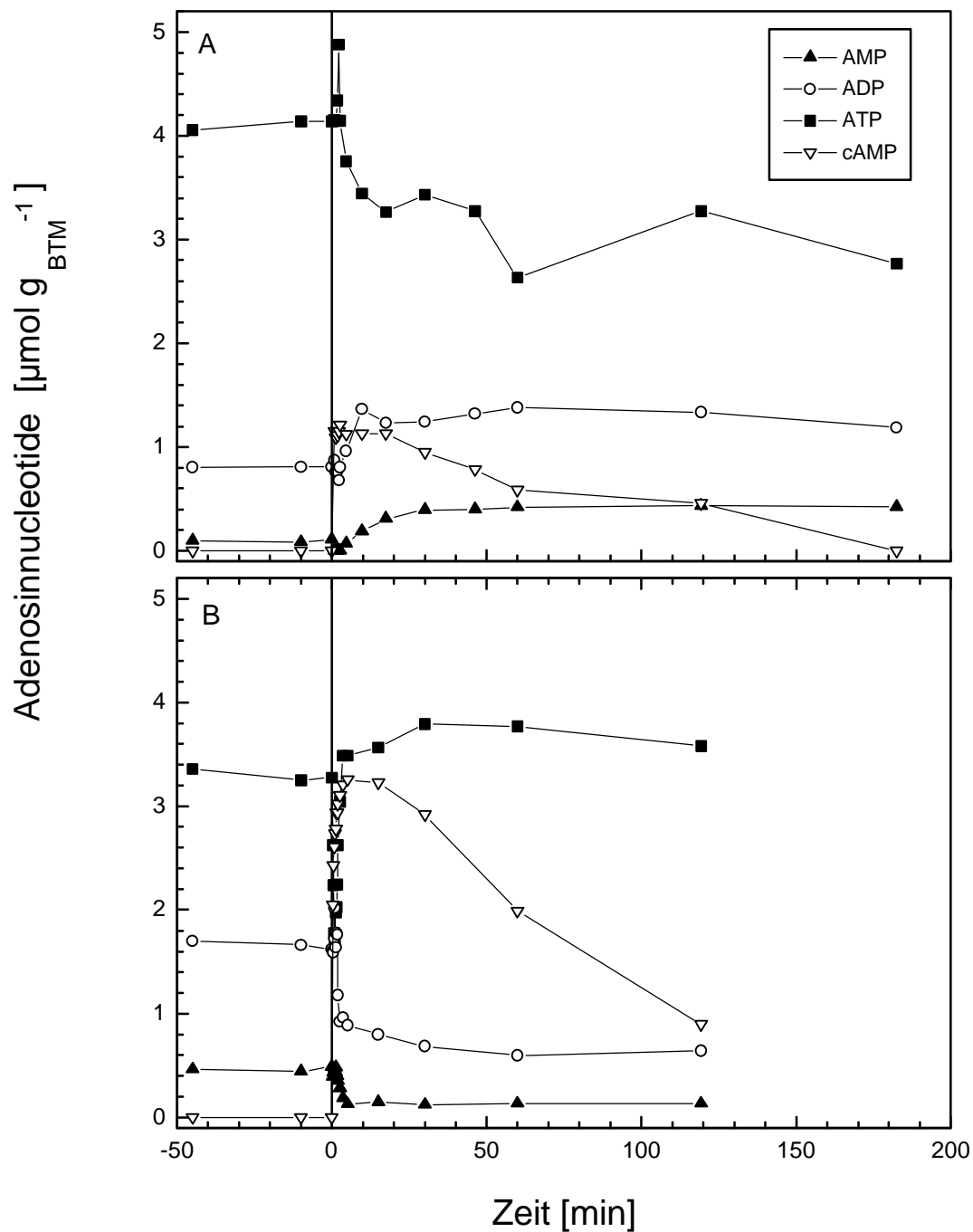


Figure 29: Adenosinnucleotidkonzentrationen nach Veränderung der Durchflußrate bei *Escherichia coli* TG1; (A) nach Erhöhen von $D = 0,066 \text{ h}^{-1}$ auf $D = 0,28 \text{ h}^{-1}$; (B) nach Reduktion von $D = 0,28 \text{ h}^{-1}$ auf $D = 0,066 \text{ h}^{-1}$

4.2.3 Oszillation

Bei vielen Organismen wurden unter den unterschiedlichsten Kultivierungsbedingungen Oszillationen beobachtet (Harrison und Topiwala, 1962). So kommt es z.B. bei *Klebsiella pneumoniae* (Menzel et al., 1997) oder bei *Enterococcus faecalis* (Snoep et al., 1992) aufgrund des Pyruvatstoffwechsels zu Schwingungen. Auch bei *Escherichia coli* wurden schon früh Oszillationen beobachtet (Sikyta und Slezak, 1965; Sikyta et al., 1966), deren Grund ebenfalls im Pyruvatstoffwechsel gesucht wurde. Bei kontinuierlichen Kultivierungen von *Escherichia coli* mit niedrigem Ammoniumangebot wurden außerdem Oszillationen aufgrund des Ammoniumtransports in die Zelle beobachtet (Majewski und Domach, 1990b).

Bei niedrigen Sprüngen bis Durchflußraten von $0,28 \text{ h}^{-1}$ kam es nach einer Übergangsphase wieder zu einem stationären Zustand, bei dem die physiologischen Werte der Bakterien konstant blieben. Bei größeren Änderungen folgte der Anpassungsphase erst eine längere Phase, in der verschiedene Parameter Schwingungen unterlagen. Diese regelmäßigen Schwingungen hörten erst nach einigen Tagen auf und pendelten sich dann auf einen konstanten Wert ein. Zum Studium der Oszillation wurden bei mehreren Durchflußraten ($0,28 - 0,37 \text{ h}^{-1}$) die Stoffwechselraten gemessen und die gewonnenen Daten miteinander verglichen. Als Ausgangsdurchflußrate, von der die Sprünge erfolgten, wurde dabei immer $D = 0,066 \text{ h}^{-1}$ eingestellt.

Die Oszillationen traten nur nach großen Sprüngen in der Durchflußrate auf. Durch eine langsame, schrittweise Annäherung konnten auch bei hohen Durchflußraten Fließgleichgewichtszustände erreicht werden, bei denen keine Schwingungen zu beobachten waren.

4.2.3.1 Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxidbildungsrate

Zu den Parametern, die Schwingungen unterlagen, gehörten unter anderem die Abgaswerte. Die Sauerstoffaufnahme sowie die Kohlendioxidbildungsrate sanken in regelmäßigen Abständen rapide ab und erholten sich dann langsam wieder (Abb. 30). Dieses Absinken deutete auf eine

spontane Verringerung des Wachstums hin, so daß die Atmungsaktivität sprunghaft abnahm. Nach relativ kurzer Zeit (15 min) erholten sich die Bakterien und die Abgaswerte stiegen langsam wieder an.

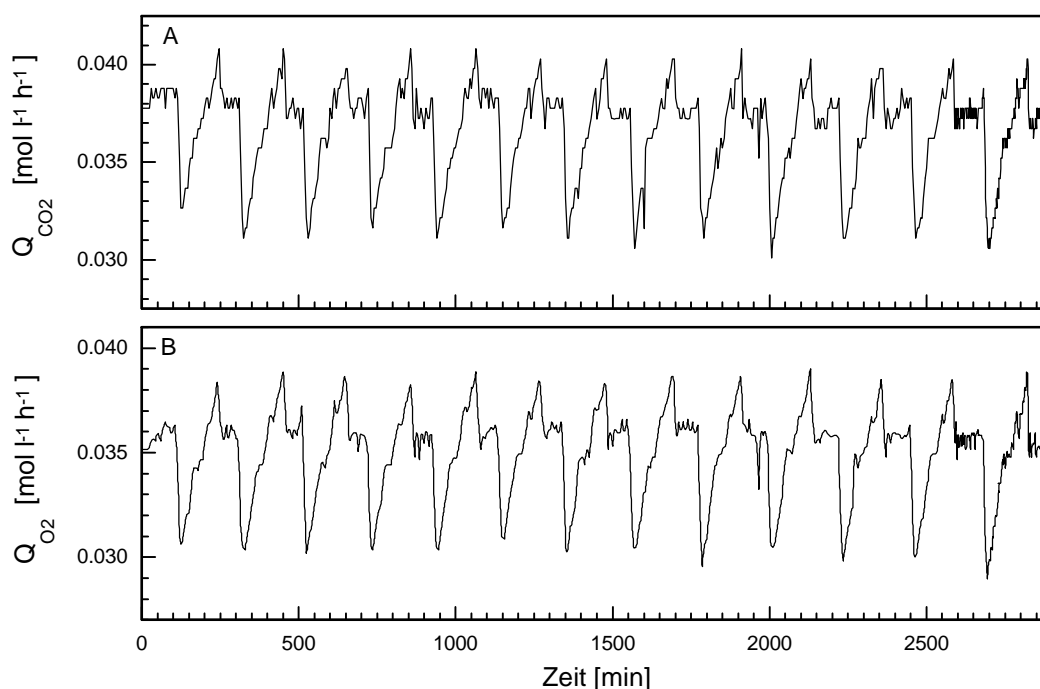


Abbildung 30: (A) Kohlendioxidbildungsrate Q_{CO_2} und (B) Sauerstoffaufnahme Q_{O_2} nach Erhöhung der Durchflußrate von $D = 0,066 \text{ h}^{-1}$ auf $D = 0,28 \text{ h}^{-1}$

Die Differenz zwischen den gemessenen maximalen und minimalen Sauerstoffaufnahme- und Kohlendioxidbildungsraten lag bei allen Durchflußraten zwischen $0,007 - 0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Die Dauer einer einzelnen Schwingung schwankte zwischen 2 - 5 h. Bei beiden Werten, der Differenz und der Dauer, war keine eindeutige Abhängigkeit von der eingestellten Durchflußrate zu erkennen. So kam es bei einer Durchflußrate von $D = 0,28 \text{ h}^{-1}$ und $D = 0,37 \text{ h}^{-1}$ zu Differenzen von $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in den Stoffwechselraten, während sich bei $D = 0,34 \text{ h}^{-1}$ nur Differenzen von $0,0075 \text{ mol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ergaben. Die Schwingungen bei den Raten $D = 0,28 \text{ h}^{-1}$ und $D = 0,41 \text{ h}^{-1}$ traten alle 4,5 h auf, wohingegen Sie bei $D = 0,34 \text{ h}^{-1}$ und $D = 0,37 \text{ h}^{-1}$ alle 2,5 h stattfanden (Tab. 7). Bei den durchgeführten Versuchen konnten keine eindeutigen Abhängigkeiten der Schwingungsdauer oder der Differenz von der eingestellten Durchflußrate und somit von der Verdoppelungszeit erkannt werden.

Tabelle 7: Verdoppelungszeit t_d sowie die Differenz zwischen den maximalen und minimalen Sauerstoffaufnahme- bzw. Kohlendioxidbildungsraten (Q) und zeitliche Dauer einer Schwingung bei *Escherichia coli* TG1 im Chemostaten; in Klammern steht die Anzahl der durchgeführten Shift-Experimente

D [h^{-1}]	0,28 (6)	0,3 (3)	0,34 (3)	0,37 (1)	0,41 (2)
t_d [h]	2,5	2,3	2,0	1,9	1,7
Dauer [h]	$4,5 \pm 0,35$	$3,8 \pm 0,4$	$2,5 \pm 0,45$	2,5	$4,5 \pm 0,4$
Q [$\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$]	0,01	0,009	0,0075	0,01	0,008

Der respiratorische Quotient blieb bei allen gemessenen Oszillationen im Rahmen der Meßgenauigkeit konstant bei $RQ = 1,02 \pm 0,02$, was im Bereich des sonst gemessenen Quotienten lag (s. 4.1.6). Es gab also keine Veränderungen im Stoffwechsel, die Einfluß auf den respiratorischen Quotienten gehabt hätten. Bei einer Oszillation aufgrund des Pyruvatstoffwechsels wurde erst eine Akkumulation und anschließend die Aufnahme des Pyruvats beobachtet (Sikyta und Slezak, 1965; Sikyta et al., 1966). Die Akkumulation von Pyruvat bedingt ein Absinken des RQ und der Abbau des akkumulierten Pyruvats einen Anstieg, so daß ein Schwingen des RQ um 1,0 zu erwarten wäre. Da während der Oszillation weder der RQ nennenswerten Änderungen unterlag, noch Pyruvat im Kulturüberstand nachgewiesen werden konnte, wurde der Pyruvatstoffwechsel als Ursache für die beobachteten Schwingungen ausgeschlossen.

Das spontane Absinken der Atmungsaktivität deutete auf eine Reduktion der anabolen Stoffwechselaktivität hin, die keine sichtbaren makroskopischen Veränderungen bewirkte. Sowohl die bestimmte Biotrockenmasse als auch die Zellzahl blieben während der Oszillation konstant (Abb. 31). Bei der mikroskopischen Untersuchung war keine Veränderung der Größe oder Form der Bakterien zu erkennen.

Das bedeutet, daß die Reduktion der anabolen Aktivität nur von sehr kurzer Dauer gewesen sein kann, da es ansonsten durch ein Auswaschen der Zellen zu einer erkennbaren Reduktion der

Biomasse gekommen wäre.

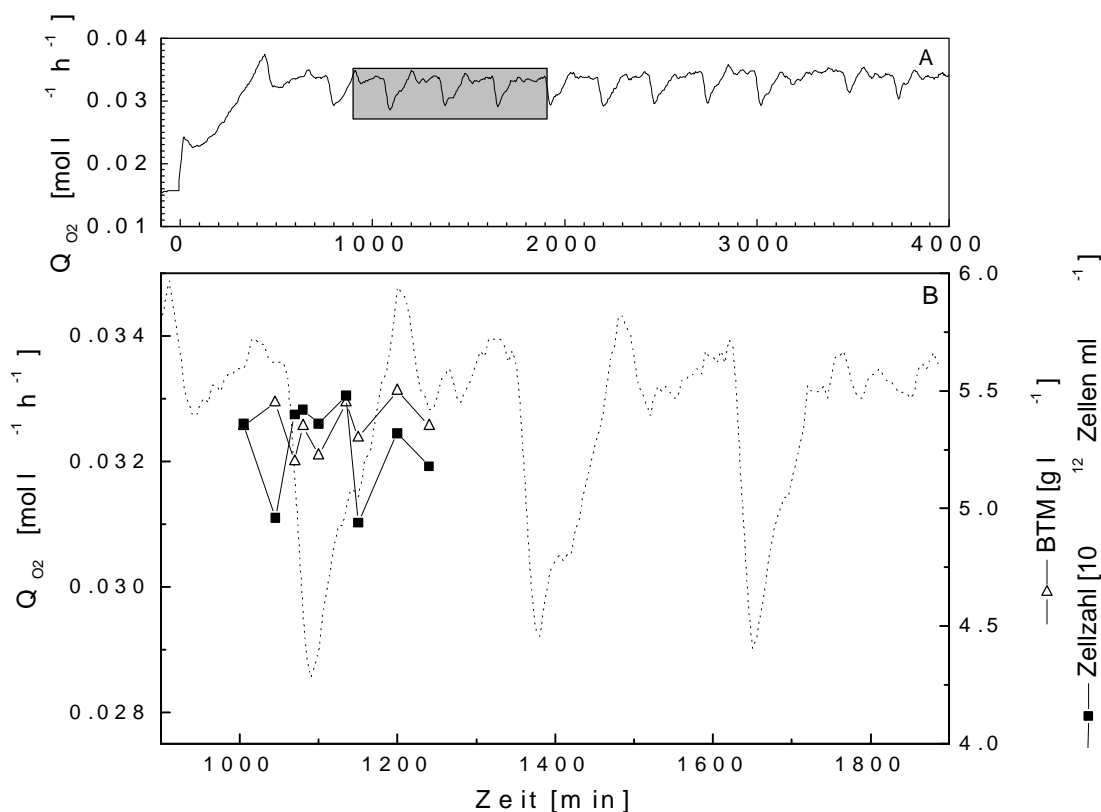


Figure 31: (A) Sauerstoffaufnahme rate und (B) Optische Dichte und Zellzahl während der Oszillation von *Escherichia coli* TG1 bei $D = 0,28 \text{ h}^{-1}$ in der kontinuierlichen Kultivierung; der grau-unterlegte Kasten ist in (B) vergrößert dargestellt

4.2.3.2 AEC

In Abbildung 32 ist zu erkennen, daß es zu einem Steigen des AECs kam, als die sinkende Sauerstoffaufnahme rate und die sinkende Kohlendioxidbildungsrate auf eine Reduktion der Stoffwechselaktivität der Bakterien hindeutete. Obwohl die ATP-Bildungsrate abnahm, stieg durch die Reduktion der ATP-verbrauchenden Prozesse die ATP-Konzentration in der Zelle, so daß sich der AEC erhöhte. Sobald die steigenden Sauerstoffaufnahme rates und Kohlendioxidbildungsraten auf ein erneutes Steigen der Stoffwechselaktivität hindeuteten, kam

es zu einem Sinken des AECs. Durch die verstärkte anabole Stoffwechselaktivität kam es zu einem erhöhten ATP-Verbrauch, so daß die ATP-Konzentration in der Zelle sank, was ein Sinken des AECs bedingte.

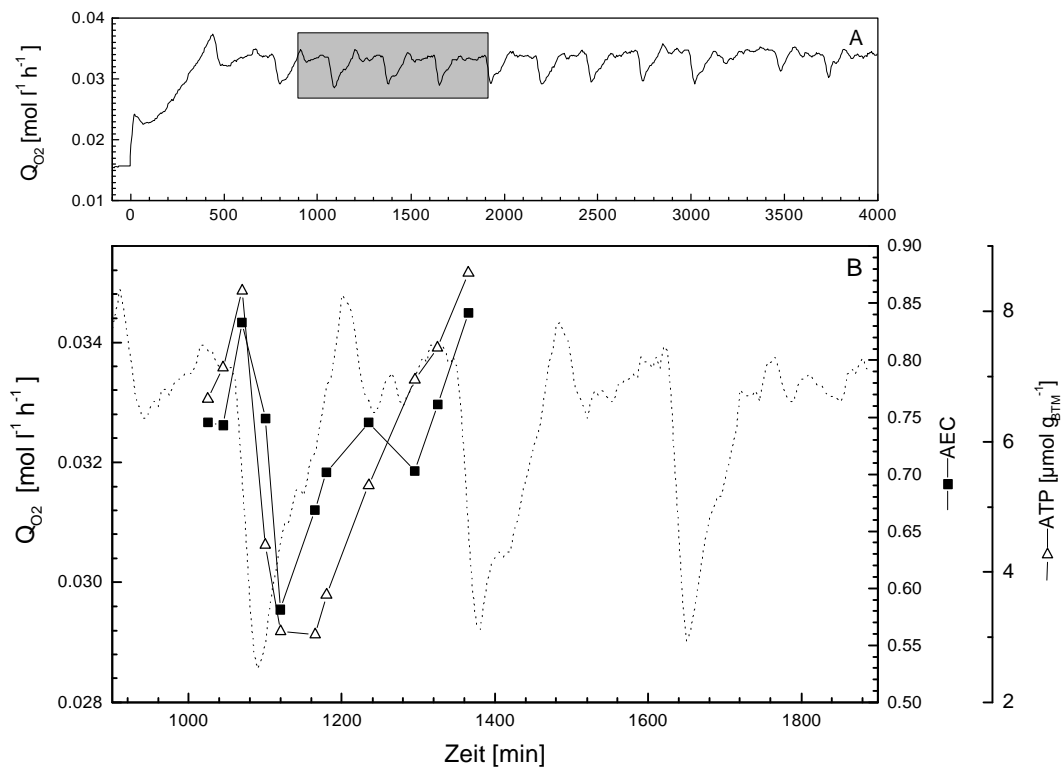


Abbildung 32: (A) Sauerstoffaufnahme Q_{O_2} und (B) AEC während der Oszillation von *Escherichia coli* TG1 bei $D = 0,28 \text{ h}^{-1}$ nach der Erhöhung der Durchflußrate von $D = 0,066 \text{ h}^{-1}$; der grau-unterlegte Kasten wurde in (B) vergrößert dargestellt

Die Veränderungen des AECs während der Oszillationen zeigten deutlich, daß der gesamte Bakterienstoffwechsel sich periodisch wiederholenden Änderungen unterlag. Obwohl die ATP-Bildungsrate sank, kam es zu einem Anstieg der ATP-Konzentration in der Zelle, die sich nur durch stark reduzierten Verbrauch an ATP begründen ließ. Das bedeutet, daß die Bakterien eine erheblich verringerte anabole Stoffwechselaktivität aufwiesen.

4.2.3.3 Methylglyoxal

Nach Erhöhung der Durchflußrate kam es zur Akkumulation von Methylglyoxal. Bei den niedrigen Sprüngen kam es nach einiger Zeit durch Abbau und Auswaschen zu einer Abnahme der Methylglyoxal-Konzentration bis nach einigen Stunden kein MGO mehr nachgewiesen werden konnte. Bei den größeren Sprüngen kam es zu einer deutlich höheren MGO-Akkumulation, wobei die Konzentration während der Oszillation ebenfalls Schwingungen unterlag (Abb. 33).

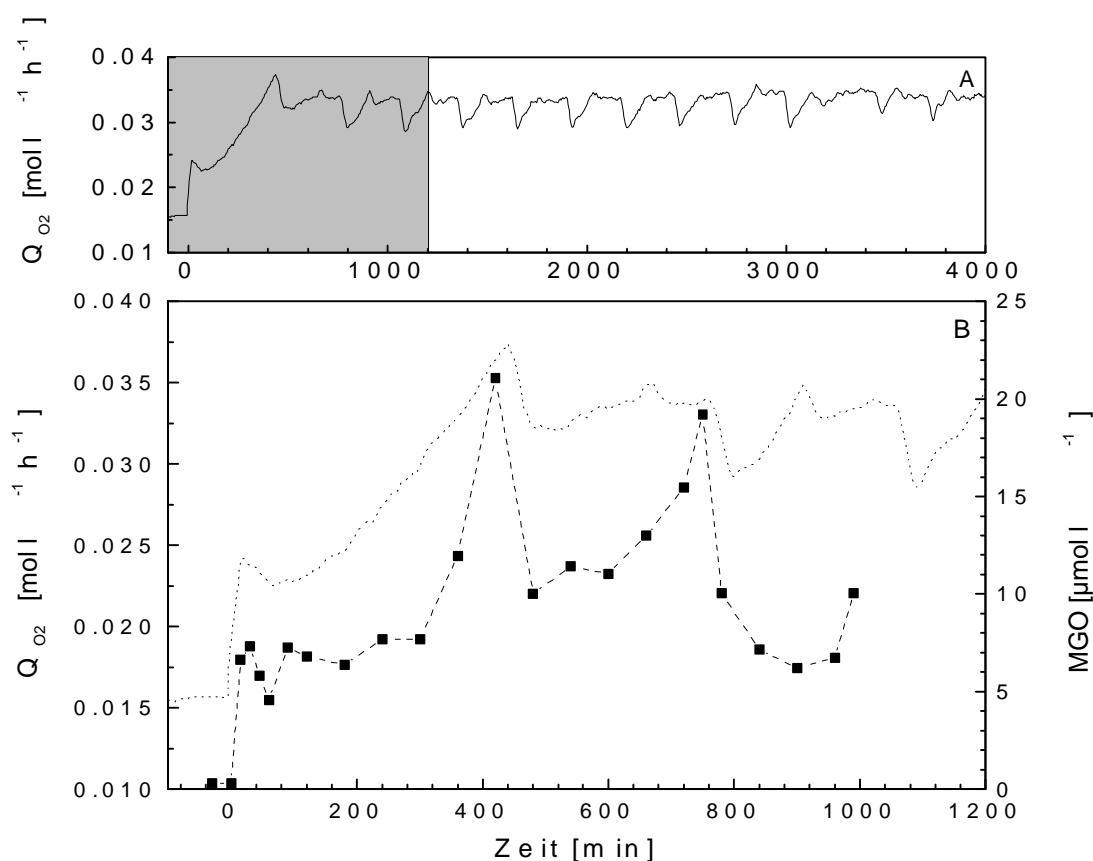


Figure 33: (A) Sauerstoffaufnahme rate und (B) Methylglyoxalkonzentration während der Oszillation von *Escherichia coli* TG1 bei $D = 0,28 \text{ h}^{-1}$; der grau-unterlegte Kasten ist in (B) vergrößert dargestellt

Die Konzentration nahm nach Erhöhen des Zuflusses bis über $0,02 \text{ mmol l}^{-1}$ zu. Nach Erreichen dieser Konzentration kam es zu einer Reduktion der Stoffwechselaktivität, so daß der MGO-Gehalt durch Auswaschen und Abbau absank. Sobald die Konzentration des MGOs genügend gesunken war, stieg die Stoffwechselaktivität der Bakterien wieder langsam an. Dadurch kam es erneut zur Akkumulation von Methylglyoxal bis eine Konzentration $c_{\text{MGO}} = 0,02 \text{ mol l}^{-1}$ erreicht wurde. Während sämtlicher Oszillationen konnte weder Acetat noch Glucose im Medium nachgewiesen werden. Die Glucose wurde demnach immer vollständig von den Bakterien metabolisiert.

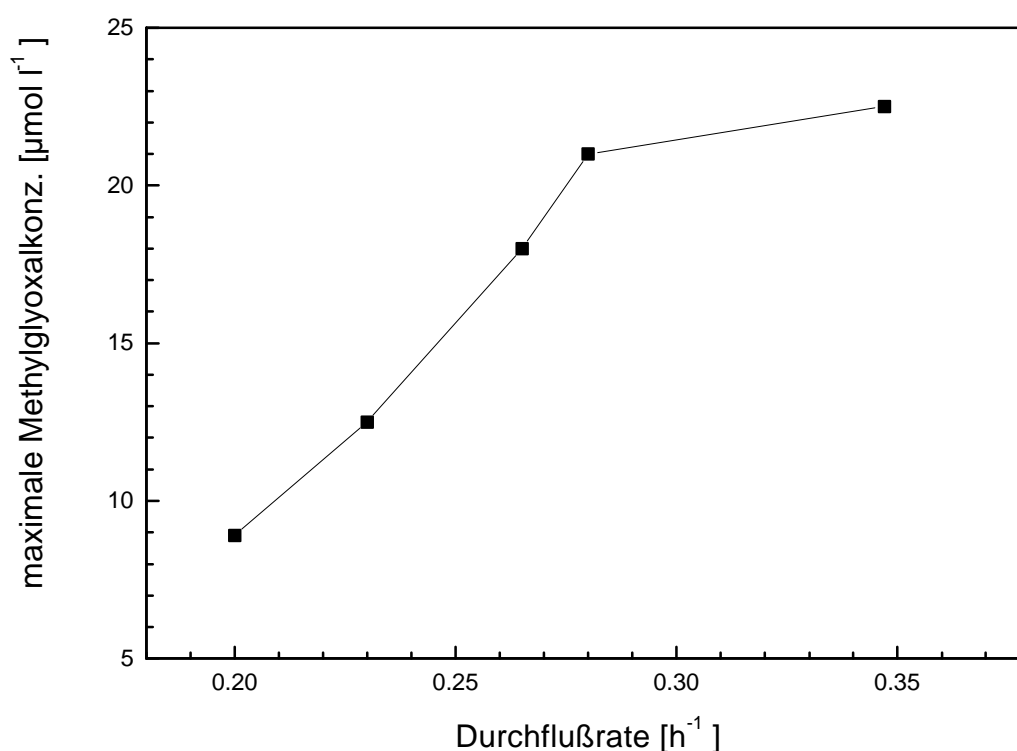


Abbildung 34: Maximal erreichte Methylglyoxal-Konzentration bei *Escherichia coli* TG1 nach Erhöhung der Durchflußrate von $D = 0,066 \text{ h}^{-1}$

Die ausgeschiedene Konzentration an Methylglyoxal stieg bei den niedrigen Sprüngen mit der Höhe des Sprunges an. Bei den Erhöhungen, die zu Oszillationen führten, konnten keine großen Unterschiede in der Konzentration des akkumulierten MGO gefunden werden (Abb. 34). Scheinbar war mit $0,02 \text{ mmol l}^{-1}$ eine Schwellenkonzentration erreicht, die eine Beeinflussung der Aktivität der Bakterien bewirkte. Die Stoffwechselaktivität verringerte sich nach Erreichen der Schwellenkonzentration bis sie durch Abbau und durch Auswaschen wieder deutlich unterschritten war. Danach erholten sich die Bakterien, erhöhten ihre Stoffwechselaktivität und akkumulierten erneut MGO.

Anscheinend konnte *E. coli* die Stoffflußverteilung, die für die niedrige Durchflußrate optimal war, nicht schnell genug umstellen und den neuen Gegebenheiten anpassen. Der Abbau der Glucose durch den Embden-Meyerhof-Parnas Weg wurde daher ebenso verstärkt wie der Abbau durch den bei niedrigen Durchflußraten aktiven Methylglyoxal-Nebenweg. Dadurch kam es zu einer Akkumulation des wachstumshemmenden Intermediates Methylglyoxal, das die Schwingungen verursachte.

Als Ursachen für die Oszillationen bei der Kultivierung von Bakterien werden in der Literatur verschiedene Möglichkeiten diskutiert (Sikyta und Slezak, 1965; Majewski und Domach, 1990b; Snoep et al., 1992). Eine Oszillation aufgrund des Ammoniumtransportes, die bei niedrigen Ammoniumangebot auftreten kann (Majewski und Domach, 1990b), konnte ausgeschlossen werden, da Ammonium im ausreichenden Maß vorlag. Bei Schwingungen, deren Ursache im Pyruvatstoffwechsel liegen, ist eine Akkumulation von Pyruvat im Medium zu beobachten (Sikyta und Slezak, 1965). Da dies bei den durchgeführten Versuchen nicht der Fall war und auch keine Schwingungen im RQ zu beobachten waren, stellte der Pyruvatstoffwechsel ebenfalls keine ausreichende Erklärung dar.

Die Oszillationen traten nur nach einem größerem Sprung in der Durchflußrate auf, so daß die Ursache wahrscheinlich mit der Anpassung an die neuen Konditionen zu tun hatte. Die Bakterien waren im Chemostaten an ein Leben mit limitierten Nährstoffen adaptiert und in der Lage, auf kurzfristige Erhöhung des Substratangebots spontan zu reagieren. Die in der Natur selten vorkommenden starken Veränderungen über einen längeren Zeitraum überforderten den Organismus. Die erste Reaktion erfolgte sehr spontan, aber die endgültige Anpassung nahm relativ viel Zeit in Anspruch. Sichtlich war *E. coli* nicht in der Lage seinen kompletten

Stoffwechsel schnell genug umzustellen, so daß es zur Akkumulation eines wachstumshemmenden Intermediaten kommen konnte. Überschritt die Konzentration dieses Intermediates eine Schwellenkonzentration, so kam es als Folge zu Oszillationen, die sich auf den gesamten Stoffwechsel auswirkten. Es kam kurzzeitig zu einer deutlichen Reduktion der anabolen Stoffwechselaktivität.

4.3 Hochzelldichtekultivierung

Die Hochzelldichtekultivierung von *Escherichia coli* TG1:p λ FGFB unterteilte sich in drei Phasen: (i) Satzkultivierung (ii) Fed-Batch I und (iii) Fed-Batch II (Abb. 35). Während der Satzkultivierung, die der Anzucht der Bakterien diente, konnten die Bakterien unlimitiert bei maximaler Wachstumsrate wachsen. In der anschließenden Fed-Batch Phase kam es zu einem Wachstum bei einer festgesetzten Wachstumsrate unter Kohlenstofflimitierung, indem mit einem exponentiell steigenden Massenstrom das neue Medium zugefüttert wurde. Bei einer Zelldichte von 45-50 g_{BTM} l⁻¹ erfolgte dann die Induktion, die die dritte Phase einleitete, in der bei kohlenstofflimitiertem Wachstum bFGF produziert wurde.

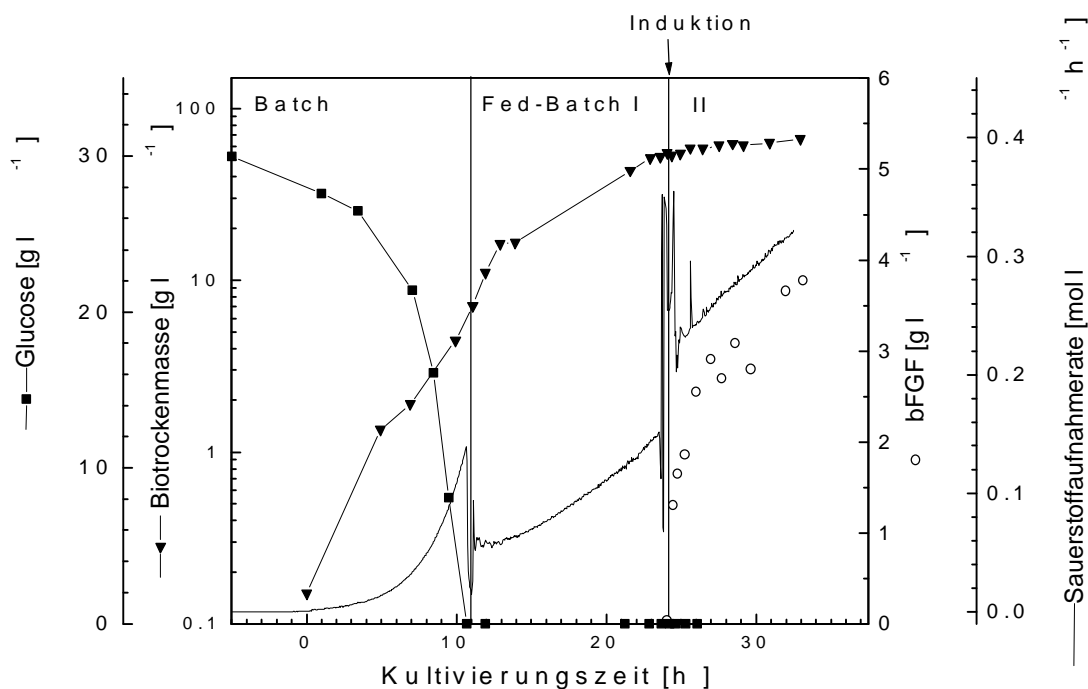


Figure 35: Kultivierungsverlauf zur temperaturinduzierten Produktion von bFGF mit *Escherichia coli* TG1:p λ FGFb im Hochzelldichteverfahren (Seeger et al., 1995). Die Kultivierung in der ersten Fed-Batch Phase erfolgte bei $\mu_{\text{set}} = 0,12 \text{ h}^{-1}$, während nach der Induktion die Wachstumsrate auf $\mu_{\text{set}} = 0,08 \text{ h}^{-1}$ reduziert wurde.

Da der rekombinante *E. coli* Stamm ein temperaturinduzierbares Expressionssystem trug, wurde für die Induktion die Temperatur auf 42°C erhöht (Seeger, 1996). Sowohl die Produktbildung als auch die hohe Temperatur, bei der schon denaturierende Effekte zu beobachten waren, stellten eine starke Belastung des Bakterienstoffwechsels dar, deswegen mußte die Wachstumsrate reduziert werden, um eine zu starke Essigsäurebildung zu vermeiden (Rinas, 1997).

Im folgenden wird hauptsächlich auf die beiden Fed-Batch Phasen eingegangen, da die Veränderungen der Zellphysiologie durch die temperaturinduzierte bFGF-Produktion eines rekombinanten *E. coli* Stammes betrachtet wurde. Die Bedingungen in den Fed-Batch-Phasen waren untereinander vergleichbar, da durch das gesteuerte Zufüttern ein glucoselimitiertes Wachstum mit festgelegter Wachstumsrate möglich war.

Nach der Induktion wuchsen die Bakterien mit einer Wachstumsrate von $\mu = 0,023 \text{ h}^{-1}$ weiter, die somit deutlich unter der gewünschten Rate von $\mu_{\text{set}} = 0,08 \text{ h}^{-1}$ lag. Diese Wachstumsinhibierung war auch bei nicht produzierenden Vergleichszellen nach der Temperaturerhöhung zu beobachten, aber in einem sehr viel geringerem Ausmaß (Rinas, 1997). Das heißt, nicht nur die Hitzeschockreaktion hatte Einfluß auf das Wachstum, sondern auch das produzierte Protein. Durch die bFGF-Produktion kam es zum einen zu einer Verstärkung der Hitzeschockreaktion und zum anderen reduzierte die Anwesenheit falsch gefalteter Proteine das Wachstum (Rinas, 1997).

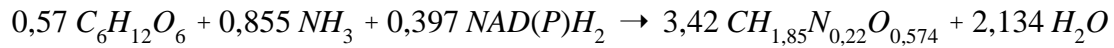
Der reale kohlenstoffbezogene Biomasseausbeutekoeffizient $Y_{X/S}$ war in der Fed-Batch Phase II ($Y_{X/S} = 0,3 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ g}_S^{-1}$) deutlich geringer als in der Fed-Batch Phase I ($Y_{X/S} = 0,53 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ g}_S^{-1}$), was darauf hindeutet, daß ein größerer Anteil der Glucose zu Kohlendioxid oxidiert wurde. Die Kohlendioxidbildungsrate und die Sauerstoffaufnahme nahmen nach der Induktion deutlich zu, wobei bei den bFGF-produzierenden Zellen ein stärkerer Anstieg zu beobachten war. Zur Überprüfung wurden die stöchiometrischen Gleichungen ermittelt (Tab. 8), wobei davon ausgegangen wurde, daß die Glucose ausschließlich zur Bildung von Kohlendioxid und Biomasse (inklusive bFGF) genutzt wurde. Diese Annahme konnte getroffen werden, da es über den gesamten Kultivierungszeitraum kaum zur Bildung organischer Säuren kam. Es wurden 95% des Kohlenstoffs in Form von Kohlendioxid und Biomasse wiedergefunden (Rinas, 1997). Die Ermittlung der dissimilierten und assimilierten Fraktion der Glucose zeigte eine deutliche

Zunahme des dissimilierten Anteils von 43% auf 70% (Abb. 36). Bei den Kontrollzellen kam es ebenfalls durch die Temperaturerhöhung zur verstärkten Dissimilation, die aber mit einem Anstieg auf ca. 60% geringer ausfiel (Rinas, 1997).

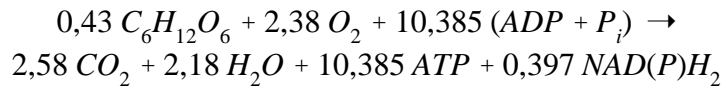
Tabelle 8: Stöchiometrie der Glucosemetabolisierung während der Hochzelldichtekultivierung eines bFGF-produzierenden *E. coli*

Fed-Batch Phase I; 30°C

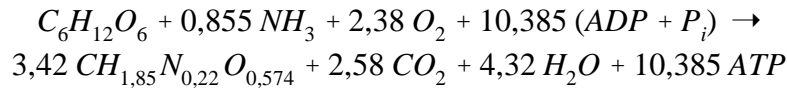
Assimilation



Dissimilation

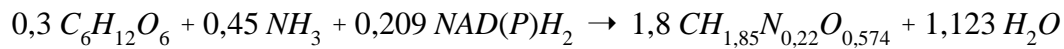


Gesamtstöchiometrie

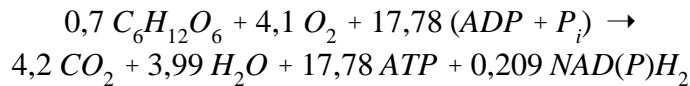


Fed-Batch Phase II; 42°C

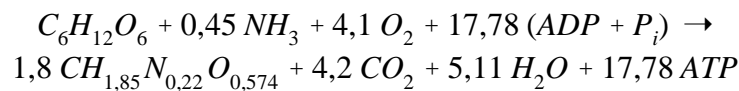
Assimilation



Dissimilation



Gesamtstöchiometrie



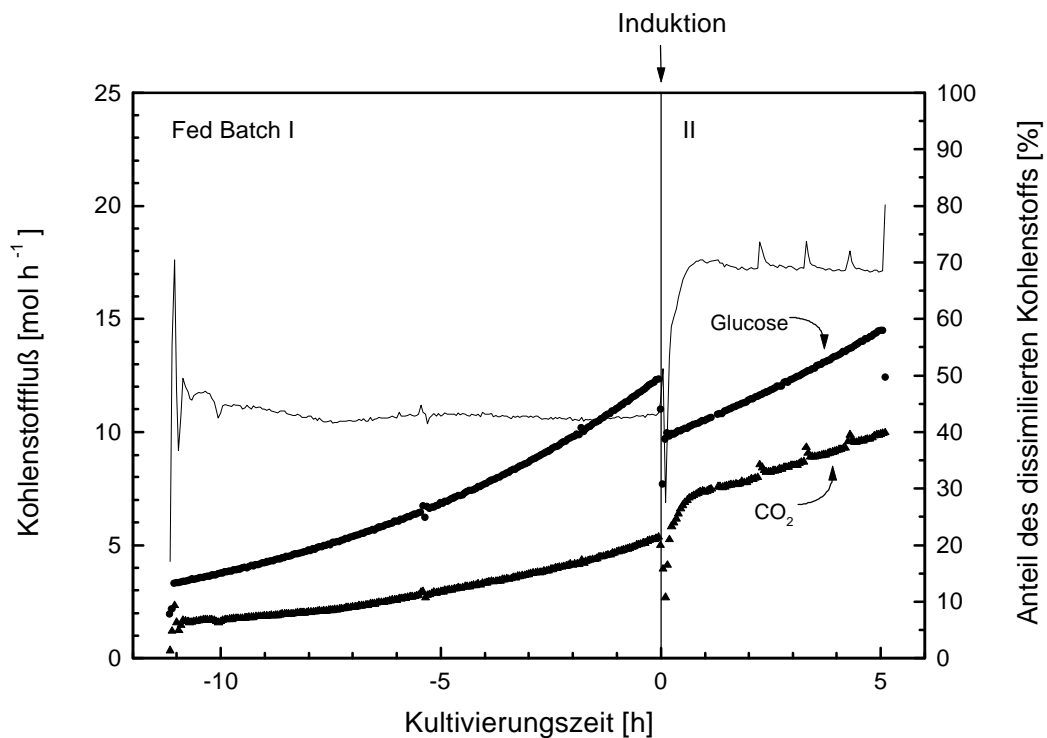


Abbildung 36: Absolute Glucoseaufnahme $[\text{mol h}^{-1}]$ und CO_2 -Bildungsrate $[\text{mol h}^{-1}]$ während der Fed-Batch Phasen einer Hochzelldichtekultivierung eines bFGF-produzierenden *Escherichia coli*. Zusätzlich wurde die zeitabhängige Fraktion der dissimilierten Glucose aufgetragen.

Da die Temperaturerhöhung und die bFGF-Produktion sowohl Einfluß auf das Wachstum als auch auf die Sauerstoffaufnahme hatten, war auch eine Veränderung des Energiestoffwechsels der Zelle als Folge der Induktion zu erwarten. Die Induktion bewirkte eine Verringerung des sauerstoffbezogenen und des energetischen Ausbeutekoeffizienten um ca. die Hälfte (Rinas, 1997). Durch die Synthese von bFGF kam es zu einer zusätzlichen Reduktion dieser Biomasseausbeutekoeffizienten (Tab. 9).

Tabelle 9: Die Fraktion der dissimilierten Glucose ($N_D \cdot (N_D + N_A)^{-1}$), die sauerstoffbezogenen und die energetischen Biomasseertragskoeffizienten in den beiden Fed-Batch Phasen einer Hochzelldichtekultivierung von Kontrollzellen und eines bFGF-produzierenden *E. coli*. Die Werte für die Kontrollzellen *E. coli* TG1:pCYTEXP1 wurden von Rinas (1997) übernommen.

	Fed-Batch Phase I	Fed-Batch Phase II	Fed-Batch Phase II
	30°C	42°C	42°C
	TG1:pλFGFB	TG1:pλFGFB	TG1:pCYTEXP1
$\frac{N_D}{N_A + N_D}$	0,43	0,7	0,6
$Y_{X/O}$ [g _{BTM} g _{O2} ⁻¹]	1,185	0,363	0,572
Y_{ATP} [g _{BTM} mol _{ATP} ⁻¹]	8,7	2,67	4,21

Um noch genaueren Aufschluß über den Energiezustand der Zellen zu bekommen, wurden die Adenosinnucleotide vor und nach der Hitzeinduktion bestimmt. Nach der Induktion war ein Absinken des ATP-Spiegels und zugleich eine deutliche Zunahme des AMP-Gehalts zu erkennen, während der ADP-Gehalt nur geringfügig anstieg (Abb. 37A + B). Diese Veränderungen bewirkten ein Sinken des AEC, obwohl die ATP-Bildungsrate aufgrund der erhöhten Sauerstoffaufnahme nach der Induktion anstieg.

Dies und die verringerte energetische Biomasseausbeute deuten darauf hin, daß nach der Temperaturerhöhung deutlich mehr ATP verbraucht wurde als zuvor. Da die bFGF Produktion die Reaktion der Zellen auf die Hitzeinduktion verstärkte, waren die Ursachen sowohl in der Temperaturerhöhung als auch in der zusätzlichen Proteinsynthese zu suchen. Obwohl die Proteinsynthese den energieaufwendigsten Teil der Biomassebildung darstellt (Stouthamer, 1973), konnte die Reduktion der Koeffizienten nicht allein durch die zusätzliche Synthese begründet werden. Die Produktion des bFGF würde höchstens eine Steigerung des ATP-Bedarfs um 10% bewirken (Rinas, 1997). Die Erhöhung des ATP-Bedarfs läßt sich somit nur auf die Primär- und Sekundäreffekte der Temperaturerhöhung und der Proteinproduktion zurückführen.

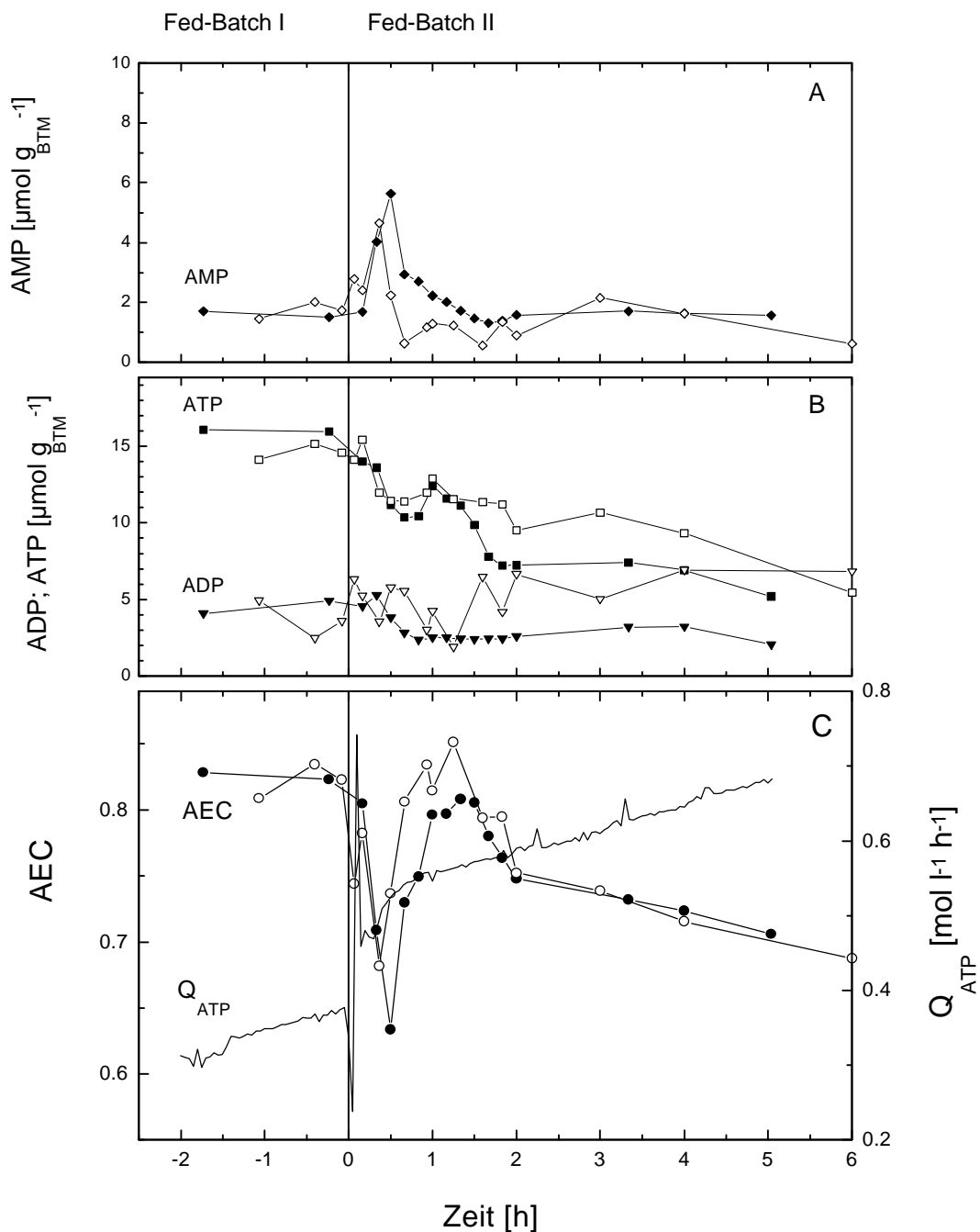


Figure 37: (A) AMP-Konzentrationen, (B) ADP- und ATP-Konzentrationen und (C) AEC und ATP-Bildungsrate vor und nach der Hitzeinduktion bei $t = 0$ von zwei unabhängigen Hochzelldichtekultivierungen (HDF I und II) des bFGF-produzierenden *Escherichia coli* TG1:pλFGFb. Die Berechnung der ATP-Bildungsrate erfolgte aus der Sauerstoffaufnahme (Rate) ($Q_{\text{ATP}} = 2 \cdot Q_{\text{O}_2} \cdot Y_{\text{ATP/O}}$); offene Symbole und Q_{ATP} gehören zur HDF I; geschlossene Symbole zur HDF II

Die Bakterien reagierten durch verstärkte Synthese verschiedener Proteine auf die Temperaturerhöhung. Viele dieser sogenannten Hitzeschockproteine sind als Chaperone an der Proteinfaltung oder aber der Renaturierung bzw. dem proteolytischen Abbau hitzedenaturierter Proteine beteiligt. Die bFGF-Produktion verstärkt die Hitzereaktion, so kam es unter anderem zu einer dreifach erhöhten Syntheserate der Chaperone (Rinas, 1997).

Auf den zweidimensionalen Gelen zur Trennung des Gesamtproteins erschienen zusätzliche Proteinspots, deren isoelektrischer Punkt zu niedrigerem pH verschoben war. Die so entstandenen multiplen Spots tauchten nur bei den bFGF-produzierenden Zellen auf (Rinas, 1997). Das Auftreten dieser zusätzlichen Spots war wahrscheinlich Folge einer Phosphorylierung von Proteinen. Die Phosphorylierung von Hitzeschockproteinen, die unter anderem die Affinität zu falsch gefalteten Proteinen erhöhen kann (Sherman und Goldberg, 1993), wurde schon mehrfach beobachtet (Zylisc et al., 1983; McCarty und Walker, 1991).

Die durch die Temperaturerhöhung und die bFGF-Synthese notwendigen Prozesse - Proteinfaltung, Proteolyse und Renaturierung - finden unter Verbrauch von ATP statt. Dabei hat wahrscheinlich die Proteinfaltung den größten Anteil am zusätzlichen ATP-Verbrauch und damit auch am sinkenden AEC. Eine signifikante Steigerung des Substratverbrauchs für den Erhaltungsstoffwechsel durch die zusätzliche Synthese eines rekombinanten Proteins wurde schon von Bhattacharya und Dubey (1995) beobachtet. Bei der chaperonvermittelten Proteinfaltung muß ein ATP-verbrauchender Zyklus durchlaufen werden. Da bFGF zu den langsam faltenden Proteinen gehört, wird dieser Zyklus vermutlich mehrfach durchlaufen, was einen erhöhten ATP-Verbrauch bedingt. Dadurch kam es direkt nach dem Temperatursprung zu einer Abnahme des AECs.

Eine halbe Stunde nach Induktion kam es dann wieder zu einem Anstieg des AECs, der sich zum einen durch die stark reduzierte Wachstumsrate und zum anderen durch die erhöhte ATP-Bildungsrate begründen ließ. Wie die Versuche im Chemostaten gezeigt hatten, bewirkte eine Verringerung der Wachstumsrate einen deutlichen Anstieg des AEC. Gleichzeitig stieg in diesem Zeitraum die ATP-Bildungsrate deutlich an, so daß der steigende ATP-Bedarf besser gedeckt werden konnte. Dies zeigte sich auch in dem wieder steigenden ATP-Spiegel in der Zelle.

Nach einiger Zeit kam es zu einem erneuten Sinken des AECs. Ungefähr zwei Stunden nach dem Temperatursprung war ein sehr niedriger AEC erreicht, der danach nur noch langsam absank. Zum gleichen Zeitpunkt war ein deutlicher Verlust der Teilungsfähigkeit der Zellen zu beobachten. Außerdem kam es zu einer deutlichen Reduktion der Produktionsrate von bFGF. Die Osmolalität des Mediums erreichte ebenfalls zu diesem Zeitpunkt ihr Minimum, was die Zellen zusätzlich unter hypotonischen Streß stellte. Die hypotonische Streßsituation spiegelte sich unter anderem in dem Vorhandensein periplasmatischer Proteine im Medium wider. Um die Vitalität der Zelle zu gewährleisten mußte mehr Energie aufgewandt werden, da nun zusätzliche Prozesse notwendig wurden, um das Membranpotential aufrecht zu erhalten. So konnte beobachtet werden, daß die Osmolalität des Mediums ab einem bestimmten Wert konstant gehalten wurde, indem eine ausgeglichene Aufnahme und Ausscheidung unterschiedlicher Substrate erfolgte (Rinas, 1997). Zwei Stunden nach der Hitzeinduktion waren die Zellen kaum noch in der Lage, sich zu teilen oder ein Fremdprotein zu produzieren. Sämtliche Prozesse dienten zu diesem Zeitpunkt der Aufrechterhaltung der Zellvitalität.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Temperaturinduktion eines rekombinanten Proteins eine starke Beeinträchtigung des Wirtsmetabolismus bewirkt. Durch die Induktion kam es anfänglich zu einem deutlichen Sinken des AECs, der sich wahrscheinlich neben der üblichen Hitzeantwort hauptsächlich auf die Proteinfaltung zurückführen läßt. Durch die verringerte Wachstumsrate und der gleichzeitig deutlich ansteigenden ATP-Bildungsrate kam es zu einer kurzen Erholung des Energiegehalts und dadurch zu einem Anstieg des AECs. Zwei Stunden nach Induktion waren die Bakterien dann anscheinend so strapaziert, daß bei zusätzlich auftretenden Streßsituationen (hypotonischer Streß) der Stoffwechsel komplett auf die Aufrechterhaltung der Zellvitalität konzentriert werden mußte. Die gesamte Glucose wurde nun verbraucht, um die Erhaltungsenergie aufzubringen, so daß keine weitere bFGF-Synthese erfolgen konnte.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Stoffflüsse im aeroben Stoffwechsel bei *Escherichia coli* K12 TG1 unter glucoselimitierten Bedingungen untersucht. Dazu erfolgte ein Studium der verschiedenen Fleißgleichgewichte bei unterschiedlichen Durchflußraten und einiger dynamischer Zustände im Chemostaten.

Die vollständigen Massenbilanzen bestätigten eine gute Konsistenz der Meßwerte, die auch durch die Stoffflußmodellierung bekräftigt wurde. Die berechneten Stoffwechselraten zeigten bei niedrigen Durchflußraten die erwartete Linearität, so daß mit Hilfe der linearen Regression die Ermittlung der maximalen Ausbeutekoeffizienten sowie des Erhaltungsbedarfs erfolgen konnte. Die ermittelten Werte lagen in der Größenordnung der in der Literatur für verschiedene *Escherichia coli* Stämme angegebenen Daten.

Da die Glucose sowohl zur Energiegewinnung als auch zur Biomassebildung metabolisiert wurde, war die Verteilung der Glucose von großer Bedeutung. Die Berechnung der Verteilung zeigte, daß 55% der Glucose assimiliert wurde, was bei hohen Durchflußraten sogar noch zunahm. Dies zeigte sich sowohl in der erhöhten Biomassebildung als auch in der verringerten Kohlendioxidbildung. Die Ergebnisse der Stoffflußmodellierung bestätigten diese Beobachtung, da ebenfalls eine Verschiebung der Stoffflüsse in dieser Richtung mit steigender Durchflußrate zu beobachten war. Zum einen kam es zu einer verstärkten Nutzung des Pentosephosphatweges und zum anderen nahm der Stofffluß der Biomassebildungsreaktion zu.

Zur Berechnung der ATP-Bildungsrate war es notwendig, verschiedene Annahmen zu treffen. Zu diesen Annahmen gehört zum einen der P/O-Quotient, der sich unter aeroben Bedingungen nicht bestimmen ließ, so daß der mechanistische Wert für *E.coli* von $P/O = 2$ genutzt wurde. Zum

anderen mußten Annahmen bezüglich der verwendeten Stoffwechselwege getroffen werden, die *Escherichia coli* zum Abbau der Glucose nutzte. Die berechneten Bildungsraten wiesen in Abhängigkeit von den verwendeten Abbauwegen deutliche Unterschiede auf. Die höchste ATP-Bildungsrate wurde für den Embden-Meyerhof-Parnas Weg errechnet, während die Nutzung des Pentosephosphatweges eine leichte Verringerung bewirkte. Erheblich geringere ATP-Bildungsraten wurden für die Nutzung des Methylglyoxal-Nebenwegs bestimmt. Die Verwendung dieses Nebenweges ist daher nur sinnvoll, wenn den Bakterien genügend Energie zur Verfügung steht und die Zellen Pyruvat zur Biomassebildung benötigen.

Bei einer Durchflußrate von $D = 0,28 \text{ h}^{-1}$, was ungefähr 66% der ermittelten maximalen Wachstumsrate entspricht, kam es bei fast allen gemessenen Stoffwechselraten zu einer Divergenz von der linearen Abhängigkeit. Bei der gleichen Durchflußrate erreichte der mit steigender Durchflußrate sinkende AEC sein Minimum und blieb bei weiter ansteigender Durchflußrate konstant. Diese sichtbaren Veränderungen deuten auf eine Verschiebung im Stoffwechsel hin, der sich nur durch die bivalente Natur des limitierten Substrats begründen ließ. Die Glucose diente den Bakterien zum einem als einzige Energiequelle und zum anderen stellte sie die einzige Kohlenstoffquelle dar. Dadurch waren zwei verschiedene Arten der Limitierung möglich: die Energie- und die Kohlenstofflimitierung. Der Organismus mußte das Substrat aufteilen, so daß sowohl die katabolischen als auch die anabolen Bedürfnisse erfüllt wurden, d.h. es mußte gewährleistet werden, daß genügend Glucose katabolisiert wurde, um den Energiebedarf zu decken, aber gleichzeitig mußten Intermediate zur Biomassesynthese bereit gestellt werden.

Bei niedrigen Durchflußraten wies der hohe AEC - und der damit verbundene hohe ATP-Gehalt - sowie die niedrigere Biomassebildung auf eine C-Quellenlimitierung hin. Im Gegensatz dazu war bei hohen Durchflußraten ein niedriger AEC zu beobachten, während die Biomassebildung deutlich gestiegen war, so daß hier von einer Energiequellenlimitierung ausgegangen wurde. Möglicherweise konnte durch die Nutzung eines Alternativstoffwechsels - dem Methylglyoxal-Nebenweges - bei niedrigen Durchflußraten der Zelle mit einem geringeren Energiegewinn Pyruvat zur Verfügung gestellt werden. Bei der Nutzung des Methylglyoxalnebenwegs, dessen Enzyme bei *Escherichia coli* konstitutiv sind, kommt es zur Bildung von Pyruvat aus DHAP über zwei Intermediate - Methylglyoxal und Lactat -, wobei nur ein Flavoprotein reduziert wird,

so daß die ATP-Ausbeute sehr viel niedriger ausfällt als bei der Nutzung des Embden-Meyerhof-Parnas Weges.

Die dynamischen Versuche zeigten, daß der MGO-Nebenweg bei niedrigen Durchflußraten aktiv war. Das plötzliche Überangebot an Glucose durch die Erhöhung des Zuflusses bewirkte die Akkumulation eines Intermediates (Methylglyoxal) dieses Stoffwechselweges. Da diese Substanz schon bei relativ niedrigen Konzentrationen toxisch auf die Bakterien wirkt, kam es bei hohen Sprüngen der Durchflußrate durch das Ausscheiden wachstumshemmender Konzentrationen an Methylglyoxal zur Oszillation. Diese Schwingungen zeigten sich sowohl in der Atmungsaktivität und dem AEC als auch bei der MGO-Konzentration, während die Bakterienkonzentration konstant blieb.

Escherichia coli TG1 nutzte bei niedrigen Durchflußraten den Methylglyoxal-Nebenweg. Da bei niedrigen Verdünnungsraten ein hoher Energiegehalt der Zelle gewährleistet war, stand die Bereitstellung von Intermediaten für die Biomassesynthese im Vordergrund. Mit steigender Durchflußrate kam es zu einer Verschiebung in der Art der Limitierung, so daß die Energengewinnung in den Vordergrund rückte und daher hauptsächlich der Embden-Meyerhof-Parnas-Weg zum Abbau der Glucose genutzt wurde. Durch die alternativ nutzbaren Stoffwechselwege erhalten die Bakterien die Möglichkeit, sich besser an die äußeren Bedingungen anzupassen und gewinnen dadurch eine gewisse Flexibilität.

Bei der Nutzung von Bakterien als Wirtsorganismus ist das Erreichen hoher Zelldichten ein großer Vorteil, da dies eine höhere Produktausbeute ermöglicht. Der verwendete *Escherichia coli* K12 Stamm wies zum einen relativ hohe Ausbeutekoeffizienten auf und zum anderen eine sehr niedrige Essigsäurebildungsrate, was die Verwirklichung hoher Bakterienkonzentrationen erleichtert. Mit *Escherichia coli* TG1 als Wirtsorganismus wurde mittels eines Hochzelldichteverfahrens bFGF produziert, wobei nach Anzüchtung der Bakterien eine Temperaturinduktion erfolgte. Die Induktion wirkte sich auf den AEC aus, da die Bakterien sowohl wegen der hohen Temperatur als auch wegen der Bildung des Fremdproteins physiologischen Veränderungen unterlagen. Die Bakterien reagierten auf die Temperaturerhöhung mit einer verstärkten Glucosedissimilation. Trotzdem kam es direkt nach der Induktion erst zu einem deutlichen Sinken des AECs, was sich auf die Synthese des bFGFs

zurückführen ließ. Durch die erhöhte Dissimilation und der niedrigeren Wachstumsrate, die bei der Induktion herabgesetzt wurde, um eine zu hohe Essigsäurebildung zu vermeiden, kam es nach einiger Zeit wieder zu einem Anstieg des AECs. Nach zwei Stunden sank der AEC endgültig, da die Zellen zu diesem Zeitpunkt sehr viel Energie für lebenserhaltende Prozesse wie z.B. Aufrechterhaltung des Membranpotentials, benötigten.

6. Literaturverzeichnis

1. Abraham, J.A.; J.L. Whang; A. Tumolo; A. Mergia; J. Friedman; D. Gospodarowicz und J.C. Fiddes (1986): Human Basic Fibroblast Growth Factors: Nucleotide Sequence and Genomic Organization; EMBO J **5**: 2523-2528
2. Ackermann, R.S.; N.R. Cozzarelli und W. Eppstein (1974): Accumulation of Toxic Concentrations of Methylglyoxal by Wild-type *Escherichia coli* K12; J Bacteriol **119**: 357-362
3. Anraku, Y. und R.B. Gennis (1987): The Aerobic Respiratory Chain of *Escherichia coli*; Trends Biotechnol: 262-266
4. Atkinson, D.E. und G.M. Walton (1967): Adenosine Triphosphate Conversion in Metabolic Regulation; J Biol Chem **242**: 3239-3240
5. Atkinson, D.E. (1977): Cellular Energy Metabolism and its Regulation; Academic Press Ltd., London
6. Backman, K.C. (1989): Method of Biosynthesis and Cells Therefore; US Patent 4,839,286
7. Baldwin, J.E. und H. Krebs (1981): The Evolution of Metabolic Cycles; Nature **291**: 381-382
8. Barrette jr, W.C.; D.M. Hannum; W.D. Wheeler und J.K. Hurst (1988): Viability and Metabolic Capability are Maintained by *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus lactis* at Very Low Adenylate Energy Charge; J Bacteriol **170**: 3655-3659
9. Bauchop, T. und S.R. Elsdon (1960): The Growth of Microorganisms in Relation to their Energy Supply; J Gen Microbiol **23**: 457-469

10. Bech-Jensen, E. und S. Carlsen (1990): Production of Recombinant Human Growth Hormone in *Escherichia coli*: Expression of Different Precursors and Physiological Effects of Glucose, Acetate, Salts; *Biotechnol Bioeng* **36**: 1-11
11. Beeckmans, S. (1984): Some Structural and Regulatory Aspects of Citrate Synthase; *Eur J Biochem* **16**: 341-351
12. Belaich, J.P.; A. Belaich und P. Simonpietri (1972): Uncoupling in Bacterial Growth: Effect of Panthothenate Starvation on Growth of *Zymomonas mobilis*; *J Gen Microbiol* **70**: 179-185
13. Beyeler, W.; P.L. Roger und A. Fiechter (1984): A Simple Technique for the Direct Determination of Maintenance Energy Coefficient: An Example with *Zymomonas mobilis*; *Appl Microbiol Biotechnol* **19**: 277-280
14. Bhattacharya, S.K. und A.K. Dubey (1995): Metabolic Burden as Reflected by Maintenance Coefficient of Recombinant *Escherichia coli* Overexpressing Target Gene; *Biotechnol Lett* **17**: 1155-1160
15. Blattner, F.R.; G. Plunket III; C.A. Bloch; N.T. Perna; V. Burland; M. Riley; J. Collado-Vides; J.D. Glasner; C.K. Rode; G.F. Mayhew; J.Gregor; N.W. Davis; H.A. Kirkpatrick; M.A. Goeden; D.J. Rose; B. Mau und Y. Shao (1997): The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12; *Science* **277**: 1453-1462
16. Bonsignore, A. und A. de Flora (1972): Regulatory Properties of Glucose-6-phosphat Dehydrogenase; *Curr Top Cell Reg* **6**: 21
17. Bremer, H. und P.P. Dennis (1987): Modulation of Chemical Composition and Other Parameters of the Cell by Growth Rate; *Aus: Escherichia coli und Salmonella Typhimurium: Cellular and Molecular Biology*; Ed: F.C. Neidhardt; Am Soc Microbiol, Washington DC
18. Broda, P. (1968): Ribonucleic Acid Synthesis and Glutamate Excretion in *Escherichia coli*; *J Bacteriol* **96**: 1528-1534
19. Calhoun, M.W.; K.L. Oden; R.B. Gennis; M.J. Teixeira de Mattos und O.M. Neijssel (1993): Energetic Efficiency of *Escherichia coli*: Effects of Mutations in Components of the Aerobic Respiratory Chain; *J Bacteriol* **175**: 3020-3025

20. Cameron, D.C. und I-Teh Tong (1993): Cellular and Metabolic Engeneering; Appl Biochem Biotechnol **38**: 105-14
21. Chaplen, F.W.R.; W.E. Fahl und D.C. Cameron (1996a): Detection of Methylglyoxal as a Degradation Product of DNA and Nucleic Acid Components Treated with Strong Acid; Anal Biochem **236**: 262-269
22. Chaplen, F.W.R.; W.E. Fahl und D.C. Cameron (1996b): Method of Determination of Free Intracellular and Extracellular Methylglyoxal in Animal Cells Grown in Culture; Anal Biochem **238**: 171-178
23. Chapman, A.G. und D.E. Atkinson (1977): Adenine Nucleotide Concentrations and Turnover Rates. Their Correlation with Biological Activity in Bacteria and Yeast; Adv Microbiol Phys **15**: 253-306
24. Cooper, R.A. (1984): Metabolism of Methylglyoxal in Microorganisms; Ann Rev Microbiol **38**: 49-68
25. Cooper, R.A. und A. Anderson (1970): The Formation and Catabolism of Methylglyoxal During Glycolysis in *Escherichia coli*; FEBS Lett **11**: 273-276
26. de Kwaadsteniet, J.W.; J.C. Jager und A.H. Stouthamer (1976): A Quantitative Description of Heterotrophic Growth in Microorganisms; J Theor Biol **57**: 103-120
27. de Kok, H.E. und J.A. Roels (1980): Method for the Statistical Treatment of Elemental and Energy Balances with Application to Steady State Continuous-culture Growth of *Saccharomyces cerevisiae* CB426 in the Respiratory Region; Biotechnol Bioeng **22**: 1097-1104
28. Doelle, H.W.; K.N. Ewing und N.W. Hollywood (1982): Regulation of Glucose Metabolism in Bacterial Systems; Adv Biochem Eng **23**: 1-35
29. Downs, A.J. und C.W. Jones (1975): Energy Conservation in *Bacillus megaterium*; Arch Micobiol **105**: 159-167

30. Eggeling, L.; L. Sahm und A.A. de Graaf (1995): Quantification and Directing Metabolic Flux: Application to Amino Acid Overproduction; Aus: Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology: Metabolic Engineering; Ed: T. Scheper; Springer Verlag, Berlin
31. El-Mansi, E.M.T. und W.H. Holms (1989): Control of Carbon Flux to Acetate Excretion During Growth of *Escherichia coli* in Batch and Continuous Culture; J Gen Microbiol **135**: 2875-2883
32. Epstein, W.; L.B. Rothman-Denes und J. Hesse (1975): Adenosine-5:3-cyclic Monophosphate as Mediator of Catabolite Repression in *Escherichia coli*; Proc Natl Acad Sci USA **72**: 2300-2304
33. Eriksson, A.E.; L.S. Cousens und B.W. Matthews (1993): Refinement of the Structure of Human Basic Fibroblast Growth Factor; Proc Natl Acad Sci USA **88**: 3441-3445
34. Estapé, D.; van den Heuvel, J. und U. Rinas (1998): Susceptibility towards Intramolecular Disulphide-bond Formation Effects Conformational Stability and Folding of Human Basic Fibroblast Growth Factor; Biochem J **335**: im Druck
35. Farmer, I.S. und C.W. Jones (1976): The Energetics of *Escherichia coli* During Aerobic Growth in Continuous Culture; Eur J Biochem **67**: 115-122
36. Ferenci, T. (1996): Adaption to Life at Micromolar Nutrient Levels: The Regulation of *Escherichia coli* Glucose Transport by Endoinduction and cAMP; FEMS Microbiol Rev **18**: 301-317
37. Ferguson, G.P.; A.D. Chacko; C. Lee und I.R. Booth (1996): The Activity of the High-Affinity K⁺ Uptake System Kdp Sensitizes Cells of *Escherichia coli* to Methylglyoxal; J Bacteriol **178**: 3957-3961
38. Fraval, H.N.A. und D.C.H. McBrien (1980): The Effect of Methylglyoxal on Cell Division and the Synthesis of Protein and DNA in Synchronous and Asynchronous Cultures of *Escherichia coli* B/r; J Gen Microbiol **117**: 127-134
39. Fredberg, W.B.; W.S. Kistler und E.C.C. Lin (1971): Lethal Synthesis of Methylglyoxal by *Escherichia coli* During Unregulated Glycerol Metabolism; J Bacteriol **108**: 137-144

40. George, H.A., A.L. Powell; M.E. Dahlgren; W.K. Herber; W.R.Z. Maigretter; B.W. Burgess; S.M. Stirdivant und R.L. Greasham (1992): Physiological Effects of TGF α -PE40 Expression in Recombinant *E. coli* JM 109; *Biotechnol Bioeng* **40**: 437-445
41. Gospodarowicz, D.; N. Ferrara; L. Schweigerer und G. Neufeld (1987): Structural Characterization and Biological Functions of Fibroblast Growth Factor; *Endocrine Rev* **8**: 95-114
42. Gottschalk, G. (1978): *Bacterial Metabolism*; Springer Verlag, Berlin
43. Hacker, J.; M. Ott und H. Tschäpe (1991): Das Problem der Pathogenität von *Escherichia coli* und seine Bedeutung für die rekombinante DNA-Technologie; *BIOForum* **14**: 150-157
44. Han, K.; H.C. Lim und J. Hong (1992): Acetic Acid Formation in *Escherichia coli* Fermentation; *Biotechnol Bioeng* **39**: 663-671
45. Harrison, D.E.F und P. Maitra (1969): Control of Respiration and Metabolism in Growing *Klebsiella aerogenes*. The Role of Adenine Nucleotides; *Biochem J* **112**: 647-652
46. Harrison, D.E.F. und H.H. Topiwala (1974): Transient and Oscillatory States of Continuous Culture; *Adv Biochem Engin*, Vol. 3; Eds.: T.H. Ghose; A. Fiechter; N. Blakebrow; Springer Verlag, Berlin
47. Hellmuth, K. (1993): Untersuchung induzierbarer Systeme zur Herstellung rekombinanter Proteine am Beispiel des Fusionsproteins Ap:: β -Galaktosidase in *Escherichia coli*; Dissertation, TU Braunschweig
48. Hempfling, W.P. und S.E. Mainzer (1975): Effects of Varying the Carbon Source Limiting Growth on Yield and Maintenance Characteristics of *Escherichia coli* in Continuous Culture; *J Bacteriol* **123**: 1076-1087
49. Holms, W.H. (1986): The Central Metabolic Pathways of *Escherichia coli*: Relationship between Flux and Control at a Branch Point, Efficiency of Conversion to Biomass and Excretion of Acetate; Aus: *Current Topics in Cellular Regulation*; Eds.: B.L. Horecker und E.R. Stadtman; Academic Press Ltd., London

50. Holms, W.H.; I.D. Hamilton und A.G. Robertson (1972): The Rate of Turnover of the Adenosine Triphosphate Pool of *Escherichia coli* Growing Aerobically in Simple Defined Media; Arch Microbiol **83**: 95-109
51. Hopper, D.J. und R.A. Cooper (1971): The Regulation of *Escherichia coli* Methylglyoxal Synthase; A New Control Site in Glycolysis?; FEBS Lett **13**: 213-216
52. Hu, X.; J.W. Zhang; A. Persson und J. Rydstroem (1995): Characterisation of the Interaction of NADH with Proton Pumping *Escherichia coli* Transhydrogenase Reconstituted in the Absence and Presence of Bacteriorhodopsin; Biochim Biophys Acta **1229**: 64-72
53. Ifuku, O.; S. Haji; J. Kishimoto; T. Sakamoto und M. Yenagi (1986): High Yield of Biotin Expression Vector for *Escherichia coli*; Japan Patent JP 61/202686 A2; Chem Abstr **106** (1987): 170235
54. Ingraham, J.L.; O. Maaloe und F.C. Neidhardt (1983): Polymerization, Biosynthesis, Fueling and Transport; Aus: Growth of Bacterial cell; Sinauer Associated, Inc Massachusetts
55. Ingram, L.O.; T. Conway; D.P. Clark; G.W. Sewell und J.F. Preston (1987): Genetic Engineering of Ethanol Production in *Escherichia coli*; Appl Environ Microbiol **53**: 2420-2425
56. Ingram, L.O. und D.P. Clark (1991): Ethanol Production Using Engineered *Escherichia coli*; US Patent 5,028,539
57. Inoue, Y. und A. Kimura (1995): Methylglyoxal and Regulation of its Metabolism in Microorganisms; Adv Microbiol Physiol **37**: 177-227
58. Jørgensen, H.; J. Nielsen; J. Villadsen und H. Mollgaard (1995): Metabolic Flux Distribution in *Penicillium chrysogenum* During Fed-Batch Cultivations; Biotechnol Bioeng **46**: 117-131
59. Kahru, A.; T. Paalme und R. Vilu (1987): Effect of Temperature on the ATP Pool and Adenylate Energy Charge in *Escherichia coli*; FEMS Microbiol Lett **41**: 305-308

60. Kahru, A. und R. Vilu (1990): Role of Adenine Nucleotides in the Regulation of Bacterial Energy Metabolism: Theoretical Problems and Experimental Pitfalls; *Microbios* **62**: 83-92
61. Karp, P.; M.Riley; A. Pellegrini-Toole; M. Krummenacker (1997): EcoCyc: Electronic Encyclopedia of *E. coli* Genes and Metabolism; *Nuc Acids Res* **25**
62. Kashket, E.R. (1982): Stoichiometry of the H⁺-ATPase of Growing and Resting Aerobic *Escherichia coli*; *Biochemistry* **21**: 5534-5538
63. Klaidman, L.K.; A.C. Leung und J.D. Adams jr. (1995): High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Oxidized and Reduced Pyridine Dinucleotides in Specific Brain Regions; *Anal Biochem* **228**: 312-317
64. Kleman, G.L. und W.R. Strohl (1994): Acetate Metabolism by *Escherichia coli* in High-Cell-Density Fermentation; *Appl Environ Microbiol* **60**: 3952-3958
65. Knowles, C.J. (1977): Microbial Metabolic Regulations by Adenine Nucleotide Pools; *Symp Soc Gen Microbiol* **27**: 241-283
66. Korz, D.J. (1992): Entwicklung von Prozeßstrategien zur Hochzelldichtekultivierung von *Escherichia coli* TG1; Dissertation; TU München
67. Korz, D.J.; U. Rinas; K. Hellmuth; E.A. Sanders und W.D. Deckwer (1995): Simple Fed-Batch Technique for High Cell Density Cultivation of *Escherichia coli*; *J Biotechnol* **39**: 59-65
68. Kurland, C.G. und H. Dong (1996): Bacterial Growth Inhibition by Overproduction of Protein; *Mol Microbiol* **21**: 1-4
69. Lee, K.J.; D.E. Tribe und P.L. Rogers (1979): Ethanol Production by *Zymomonas mobilis* in Continuous Culture at High Glucose Concentrations; *Biotechnol Lett* **1**: 421-426
70. Majewski, R.A. und M.M. Domach (1990a): Simple Constrained-Optimization View of Acetate Overflow in *Escherichia coli*; *Biotechnol Bioeng* **35**: 732-738

71. Majewski, R.A. und M.M. Domach (1990b): Chemostat-Cultivated *Escherichia coli* at High Dilution Rate: Multiple Steady States and Drift; *Biotechnol Bioeng* **36**: 179-190
72. McCarty, J.S. und G.C. Walker (1991): DnaK as a Thermometer: Threonine-199 is Site of Autophosphorylation and is Critical for ATPase Activity; *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 9513-9517
73. Menzel, K.; A.-P. Zeng; H. Biebl und W.D. Deckwer (1997): Enzymatic Evidence for an Involvement of Pyruvate Dehydrogenase in the Anaerobic Glycerol Metabolism of *Klebsiella pneumoniae*; *J Biotechnol* **56**:135-142
74. Meyer-Ingold, W. (1993): Wound Therapy: Growth Factors as Agents to Promote Healing; *Trends Biotechnol* **11**: 387-392
75. Misra, K.; A.B. Banerjee; S. Ray und M. Ray (1995): Glyoxalase III from *Escherichia coli*: a Single Novel Enzyme for the Conversion of Methylglyoxal into D-Lactate without Reduced Glutathione; *Biochem J* **305**: 999-1005
76. Misra, K.; A.B. Banerjee; S. Ray und M. Ray (1996): Reduction of Methylglyoxal in *Escherichia coli* K12 by an Aldehyde Reductase and Alcohol Dehydrogenase; *Mol Cell Biochem* **156**: 117-124
77. Mitraki, A. und J. King (1989): Protein Folding Intermediates and Inclusion Body Formation; *Bio/Technology* **7**: 690-697
78. Mondello, F.J. (1989): Cloning and Expression in *Escherichia coli* of *Pseudomonas* Strain LB400 Genes Encoding Polychlorinated Biphenyl Degradation; *J Bacteriol* **171**: 1725-1732
79. Monod, J. (1942): *Recherchessur la Croissance des Cultures Bacteriennes*; Editeurs des Sciences et des Arts
80. Murata, K.; Y. Fukudu; M. Shimosaka; K. Watanabe; T. Saikusa und A. Kimura (1985): Phenotypic Character of the Methylglyoxal Resistance Gene in *Saccharomyces cerevisiae*: Expression in *Escherichia coli* and Application to Breeding Wild-Type Yeast Strains; *Appl Environ Microbiol* **50**: 1200-1207

81. F.C. Neidhardt (1986): *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*: Cellular and Molecular Biology; Am Soc Microbiol, Washington DC
82. Neijssel, O.M. und D.W. Tempest (1975): The Regulation of Carbohydrate Metabolism in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 Organisms, Growing in Chemostat Culture; Arch Microbiol **106**: 251-258
83. Neijssel, O.M. und D.W. Tempest (1976): Bioenergetic Aspects of Aerobic Growth of *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 in Carbon-limited and Carbon-sufficient Chemostat Culture; Arch Microbiol **107**: 215-221
84. Neijssel, O.M.; M.J. Teixeira de Mattos und D.W. Tempest (1986): Growth Yield and Energy Distribution; Aus: *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*: Cellular and Molecular Biology; Ed.: F.C. Neidhardt; Am Soc Microbiol, Washington DC
85. Neijssel, O.M.; E.T. Buurman und M.J. Teixeira de Mattos (1990): The Role of Futile Cycles in the Energetics of Bacterial Growth; Biochim Biophys Acta **1018**: 252-255
86. Nissen, T.L.; U. Schulze; J. Nielsen und J. Villadsen (1997): Flux Distribution in Anaerobic, Glucose-limited Continuous Cultures of *Saccharomyces cerevisiae*; Microbiol **143**: 203-218
87. Oliviera, E.G.; J.O. Morais und N. Pereira jr. (1992): Determination of the Energy Maintenance Coefficient of *Zymomonas mobilis*; Biotechnol Lett **14** (11): 1081-1084
88. Paalme, T.; R. Elken; A. Kahru; K. Vanatalu und R. Vilu (1997): The Growth Rate Control in *Escherichia coli* at Near to Maximum Growth Rates: the A-stat Approach; Ant van Leeuwenhoek **71**: 217-230
89. Pastan, I. und S. Adhya (1976): Cyclic Adenosine 5 -Monophosphate in *Escherichia coli*; Bacteriol Rev **40** (3): 527-551
90. Pirt, S.J. (1965): The Maintenance Energy of Bacteria in Growing Cultures; Proc R Soc B **163**: 224-231

91. Renner, W.A.; K.H. Lee; V. Hatzimanikatis; J.E. Bailey und H.M. Eppenberger (1995): Recombinant Cyclin-E Expression Activated Proliferation and Obviates Surface Attachment of Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells in Protein-free Medium; *Biotechnol Bioeng* **47**: 476-482
92. Reiling, H.E.; H. Laurila und A. Fiechter (1985): Mass Culture of *Escherichia coli*: Medium Development for Low and High Density Cultivation of *Escherichia coli* B/r in Minimal and Complex Media; *J Biotechnol* **2**: 191-206
93. Riesenberger, D.; K. Menzel; V. Schulz; K. Schuhmann; G. Veith; G. Zuber und W.A. Knorre (1990): High Cell Density Fermentation of Recombinant *Escherichia coli* Expressing Human Interferon $\alpha 1$; *Appl Microbiol Biotechnol* **34**: 77-82
94. Rinas, U. (1996): Synthesis Rates of Cellular Proteins Involved in Translation and Protein Folding are Strongly Altered in Response to Overproduction of Basic Fibroblast Growth Factor by Recombinant *Escherichia coli*; *Biotechnol Prog* **12**: 196-200
95. Rinas, U. (1997): Verfahrenstechnische, zellphysiologische und produktspezifische Aspekte der Produktion von Basischem Fibroblastenwachstumsfaktor mittels Rekombinanter *Escherichia coli*; Habilitationsschrift, TU Braunschweig
96. Roels, J.A. (1980): Application of Macroscopic Principles to Microbial Metabolism; *Biotechnol Bioeng* **22**: 2457-2514
97. Ryll, T. und R. Wagner (1991): Improved Ion-pair High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Quantification of a Wide Variety of Nucleotides and Sugar-nucleotides in Animal Cells; *J Chromatogr* **570**: 77-88
98. Schlegel, H.G. (1984): Allgemeine Mikrobiologie; Thieme Verlag, Stuttgart
99. Schlieker, H. (1995): Stöchiometrie und Energetik des aeroben Wachstums von *Trichosporum cutaneum* und *Escherichia coli* TG1 unter Berücksichtigung intrazellulärer Intermediate; Dissertation, TU Braunschweig
100. Schulze, K.L. und R.S. Lipe (1964): Relationship between Substrate Concentration, Growth Rate and Respiration Rate of *Escherichia coli* in Continuous Culture; *Arch Mikrobiol* **48**: 1-20

101. Seeger, A. (1995): Produktion des Basischen Fibroblastenwachstumsfaktors im Hochzelllichteverfahren mittels rekombinanter *Escherichia coli*; Dissertation TU Braunschweig
102. Seeger, A.; B. Schneppe; J.E.G. McCarthy; W.D. Deckwer und U. Rinas (1995): Comparison of Temperature- and Isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranoside-induced Synthesis of Basic Fibroblast Growth Factor in High-cell-density Cultures of Recombinant *Escherichia coli*; *Enzyme Microb Technol* **17**: 947-953
103. Seeger, A. und U. Rinas (1996): Two-step Chromatographic Procedure for Purification of Basic Fibroblast Growth Factor from Recombinant *Escherichia coli* and Characterization of the Equilibrium Parameters of Adsorption; *J Chromatogr A* **746**: 17-24
104. Senn, H.; U. Lendemann; M. Snozzi; G. Hamer und T. Egli (1994): The Growth of *Escherichia coli* in Glucose-limited Chemostat Cultures: a Re-examination of the Kinetics; *Biochim Biophys Acta* **1201**: 424-436
105. Sherman, M.Y. und A.L. Goldberg (1993): Heat Shock of *Escherichia coli* Increases Binding of DnaK (the hsp10 homolog) to Polypeptides by Promoting its Phosphorylation; *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 8648-8652
106. Shimizu, N.; S. Fukuzono; Y. Harad; K. Fujimori; K. Gotoh und Y. Yamazaki (1991): Mass Production of Human Epidermal Growth Factor Using Fed-Batch Cultures of Recombinant *Escherichia coli*; *Biotechnol Bioeng* **38**: 37-42
107. Sikyta, B. und J. Slezak (1965): A Periodic Phenomenon in Regulation of Pyruvate Biosynthesis in *Escherichia coli* B; *Biochim Biophys Acta* **100**: 311-313
108. Sikyta, B.; J. Slezak; R. Brookes und C.-G. Heden (1966): The Formation of Pyruvate During the Growth of *Escherichia coli* B; *Studia Biophysica* **s3**: 151-154
109. Slater, S.; T. Gallaher und D. Dennis (1992): Production of Poly-(3-Hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyvalerate) in Recombinant *Escherichia coli* Strains; *Appl Environ Microbiol* **58**: 1089-1094

110. Snoep, J.L.; M.R. de Graef; M.J. Teixeira de Mattos und O.M. Neijssel (1992): Pyruvate Catabolism During Transient State Conditions in Chemostat Cultures of *Enterococcus faecalis* NCTC 775: Importance of Internal Pyruvate and NADH/NAD ratio; J Gen Microbiol **138**: 2015-2020
111. Stephanopoulos, G. und J.J. Vallino (1991): Network Rigidity and Metabolic Engineering in Metabolite Overproduction; Science **252**: 1675-1681
112. Stouthamer, A.H. und C. Bettenhausen (1972): Influence of Hydrogen Acceptors on Growth and Energy Production of *Proteus mirabilis*; Ant van Leeuwenhoek **38**: 81-90
113. Stouthamer, A.H. (1973): A Theoretical Study on the Amount of ATP Required for the Synthesis of Microbial Cell Material; Ant van Leeuwenhoek **39**: 545-565
114. Stouthamer, A.H. (1977): Energetic Aspects of the Growth of Microorganisms; Symp Soc Gen Microbiol **27**: 285-315
115. Stouthamer, A.H. und W.H. van Versefeld (1986): Stoichiometry of Microbial Growth; Aus: Comprehensive Biotechnology; Ed.: M. Moo-Young; Pergamon Press, Oxford
116. Stouthamer, A.H. und H.W. van Versefeld (1987): Microbial Energetics should be Considered in Manipulating Metabolism for Biotechnological Purposes; Trends Biotechnol **5**: 149-155
117. Stryer, L. (1988): Biochemie; Spectrum der Wissenschaft, Heidelberg
118. Sukatsch, D.A. und A. Dziengel (1984): Acta Biotechnica - Formelsammlung Biotechnologie; Bibliomed, Melsungen
119. Teixeira de Mattos, M.J.; H. Streekstra und D.W. Tempest (1984): Metabolic Uncoupling of Substrate Level Phosphorylation in Anaerobic Glucose-limited Chemostat Cultures of *Klebsiella aerogenes* NCTC 418; Arch Microbiol **139**: 260-264
120. Teixeira de Mattos, M.J. und O.M. Neijssel (1997): Bioenergetic Consequences of Microbial Adaption to Low-nutrient Environments; J Biotechnol **59**: 117-126
121. Tempest, D.W. und O.M. Neijssel (1984): The Status of Y_{ATP} and Maintenance Energy as Biologically Interpretable Phenomena; Ann Rev Microbiol **38**: 459-486

122. Tempest, D.W. und O.M. Neijssel (1992): Physiological and Energetic Aspects of Bacterial Metabolite Overproduction; FEMS Microbiol Lett **100**: 169-176
123. Theobald, U.; W. Mailinger; M. Baltes; M. Rizzi und M. Reuss (1997): In Vivo Analysis of Metabolic Dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: I. Experimental Observations; Biotechnol Bioeng **55**: 305-316
124. Töttemeyer, S.; N.A. Booth; W.W. Nichols; B. Dunbar und I.R. Booth (1998): From Famine to Feast: The Role of Methylglyoxal Production in *Escherichia coli*; Mol Microbiol **27**: 553-562
125. Ullmann, A. und A. Danchin (1983): Role of cAMP in Bacteria; Adv Cyclic Nucleotide Res **15**: 1-53
126. Vallino, J. und G. Stephanopoulos (1990): Flux Determination in Cellular Bioreaction Networks: Applications to Lysine Fermentations; Aus: Frontiers in Bioprocessin; Eds.: S.K. Sidkar; M. Bier und P. Todd; CRC Press Boca Raton, Florida
127. Vallino, J. (1991): Identification of Branch-Point Restriction in Microbial Metabolism through Metabolic Flux Analysis and Local Network Perturbation; Dissertation, MIT Cambridge, MA
128. VanBogelen, R.A. und F.C. Neidhardt (1991): The Gene-Protein Database of *Escherichia coli*: ed 4; Electrophoresis **12**: 955-994
129. van der Zee, J.R.; P. W. Postma und K.J. Hellingwerf (1996): Quantitative Conversion of Glucose Into Glucose-6-phosphate by Intact *Escherichia coli* cells; Biotechnol Appl Biochem **24**: 225-230
130. Weber, J. (1997): Metabolische Flußverteilung in rekombinanten *Escherichia coli* bei Überproduktion von Poly- β -hydroxybutyrat; Diplomarbeit, TU Braunschweig
131. Williams, D.C.; R.M. Van Frank; R.M. Muth und J.P. Burnett (1982): Cytoplasmatic Inclusion Bodies in *Escherichia coli* Producing Biosynthetic Human Insulin Proteins; Science **215**: 687-689
132. Winter, R.B.; K.-M. Yen und B.E. Ensley (1989): Efficient Degradation of Trichlorethylene by a Recombinant *Escherichia coli*; Biotechnol **7**: 282-285

-
133. Wood, T. (1985): The Pentose Phosphate Pathway; Academic Press Ltd., London
 134. Zylicz, M.; J.H. LeBowitz; R. McMacken und C. Georgopolous (1983): The DnaK of *Escherichia coli* Possesses an ATPase and Autophosphorylating Activity and is Essential in an *in vitro* DNA Replication System; Proc Natl Acad Sci USA **80**: 5432-6435

7. Anhang

7.1 Abkürzungen und Formelzeichen

7.1.1 Abkürzungen

α KG	α -Ketoglutarat
AcCoA	Acetyl-Coenzym A
ADP	Adenosindiphosphat
AEC	Energieladung des Adenylatpools (Adenylate energy charge)
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CoA	Coenzym A
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E4P	Erythrose-4-phosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Erythrozyten Wachstumsfaktor
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas-Weg
FAD	Flavinadenindinucleotid - oxidierte Form
FADH ₂	Flavinadenindinucleotid - reduzierte Form
FMN	Flavinmononucleotid
fp	Flavoprotein
Fru6P	Fructose-6-phosphat
G3P	Glycerin-3-phosphat
GAP	Glycerinaldehydphosphat
Gluc	Glucose
Glum	Glutamin
Glut	Glutamat
HDF	Hochzelldichte-Fermentation
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MGO	Methylglyoxal

NAD	Nicotinamidadeninnucleotid - oxidierte Form
NADH ₂	Nicotinamidadeninnucleotid - reduzierte Form
NADP	Nicotinamidadeninnucleotidphosphat - oxidierte Form
NADPH ₂	Nicotinamidadeninnucleotidphosphat - reduzierte Form
OAA	Oxalacetat
P	Phosphat
PEP	Phosphoenolpyruvat
P _i	anorganisches Phosphat
pO ₂	Gelöstsauerstoff
PP-Weg	Pentosephosphat-Weg
Pyr	Pyruvat
Rib5P	Ribose-5-phosphat
RNA	Ribonucleinsäure
TCC	Tricarbonsäurezyklus

7.1.2 Symbole

α	Stoffanteil [mol mol ⁻¹] Appendix: C Kohlenstoffanteil N Stickstoffanteil
β_{NADH_2}	Anteil NADH ₂ an allen reduzierten Reduktionsäquivalenten [mol mol ⁻¹] Anzahl der verfügbaren Elektronen
ϵ_{FADH_2}	Anteil FADH ₂ an allen reduzierten Reduktionsäquivalenten [mol mol ⁻¹]
μ	Wachstumsrate [h ⁻¹]
μ_{max}	maximale Wachstumsrate [h ⁻¹] stöchiometrische Koeffizienten
σ_{fpH_2}	Anteil fpH ₂ an allen reduzierten Reduktionsäquivalenten [mol mol ⁻¹]
A	Matrix
a	verbrauchter Stickstoff pro c-mol Substrat [mol]
b	verbrauchter Sauerstoff pro c-mol Substrat [mol]
c	Konzentration [mol l ⁻¹] Appendix: A ausströmendes Gas Ac Essigsäurekonzentration CO ₂ Kohlendioxidgehalt E einströmendes Gas O ₂ Sauerstoffgehalt
C(A)	Konditionsnummer der Matrix
d	gebildetes Kohlendioxid pro c-mol Substrat [mol]
D	Durchflußrate [h ⁻¹]
D_{krit}	kritische Durchflußrate [h ⁻¹]
e	gebildete Biomasse pro c-mol Substrat [mol]
f	gebildetes Produkt pro c-mol Substrat [mol]
F	Flußrate [l h ⁻¹]
K_s	Substratkonzentration bei halbmaximalem Wachstum [g l ⁻¹]
m	maintenance-Bedarf zur Erhaltung der Zelle [mol l ⁻¹] Appendix: CO ₂ Kohlendioxidbedarf E Energiebedarf O ₂ Sauerstoffbedarfbedarf S Substratbedarf
m	Anzahl der beteiligten Metabolite

MW	Molekulargewicht [g mol^{-1}]
n	Anzahl der beteiligten Metabolite
N_A	assimilierter Anteil der Glucose [mol]
N_D	dissimilierter Anteil der Glucose [mol]
q	spezifische Stoffwechselrate [$\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$]
Q	volumetrische Stoffwechselrate [$\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$]
	Appendix:
	Ac Essigsäurebildungsrate
	BTM Biotrockenmassebildungsrate
	CO ₂ Kohlendioxidbildungsrate
	Gluc Glucosaufnahmerate
	NH ₃ Ammoniumaufnahmerate
	O ₂ Sauerstoffaufnahmerate
r	Akkumulationsrate
R(A)	Rang der Matrix
RQ	respiratorischer Quotient [mol mol^{-1}]
S	Substrat [g l^{-1}]
t	Zeit [h]
V	Volumen [l]
	Appendix:
	L Flüssigkeitsvolumen im Reaktor [l]
	N Gasvolumen unter Normbedingungen [l]
	G Begasungsvolumen [l]
x	Flüsse in der Zelle
x	dissimilierter Stickstoffanteil
X	Biomasse
y	Reduktionsäquivalenteanteil an der Gesamtstöchiometrie
Y	Ertragskoeffizienten
	Appendix:
	ATP Biomasseertragskoeffizienten für ATP [g mol^{-1}]
	X/CO ₂ Biomasseertragskoeffizienten für Kohlendioxid [g g^{-1}]
	X/O ₂ Biomasseertragskoeffizienten für Sauerstoff [g g^{-1}]
	X/S Biomasseertragskoeffizienten für Glucose [g g^{-1}]
	max maximaler Ausbeutekoeffizient
z	gebildetes Wasser bei der Assimilation der Glucose

7.2 Tabellen

Tabelle A1: Optische Dichte ($\lambda = 600\text{nm}$), Biotrockenmasse (BTM), Zellzahl, Glucose und AEC bei einer Satzkultivierung von *Escherichia coli* TG1

Zeit h	OD	BTM g/l	Zellzahl 1/ml	Glucose g/l	AEC
0	0.9	--	3.70E+11	55.55556	--
3.5	3.2	1.5	1.60E+12	43.02	--
4.5	4.8	2.4	2.70E+12	37.05	0.628
5.5	7.2	3.27	3.67E+12	29.69444	0.631
6	8.75	4.2	4.68E+12	18.88333	0.625
6.4	10	5.05	5.24E+12	10.12222	0.671
6.6	10.8	5.1	5.36E+12	2.59444	0.723
6.75	10.8	5.4	5.48E+12	0	0.802
7	10.85	5.4	5.32E+12	0	0.796
7.5	10.9	5.4	5.40E+12	0	0.825

Tabelle A2: Biotrockenmasse (BTM), Biotrockenmassebildungsrate Q BTM und Glucosegehalt bei einer kontinuierlichen Kultivierung von *Escherichia coli* TG1 unter aeroben, glucoselimitierten Bedingungen

D 1/h	BTM g/l	Glucose g/l	Q BTM g/lh
0.02	4.81	0	0.0962
0.042	5.066	0	0.22308
0.066	5.05	0	0.3333
0.134	5.29	0	0.70886
0.15	5.13125	0	0.76969
0.17	5.23	0	0.8891
0.203	5.41	0	1.09823
0.265	5.058	0	1.34037
0.276	5.53	0	1.5484
0.3	5.5312	0	1.65936
0.339	5.533	0	1.87569
0.347	5.5	0.23	1.9085
0.372	5.685	0.296	2.13188
0.388	5.88	0.26	2.28144
0.397	5.07	0.397	2.01279
0.406	5.24	--	2.12744
0.41	3.817	1.823	1.5726
0.415	1.051	6.048	0.44146

Tabelle A3: Elementare Zusammensetzung der Biotrockenmasse von *Escherichia coli* TG1 im Chemostaten unter aeroben, glucoselimitierten Bedingungen

D	C	H	N	O
1/h	%	%	%	%
0.02	42.25	7.015	10.415	--
0.04	40.81	6.585	9.235	--
0.066	42	6.77	11.875	33.35863
0.14	43.11	6.935	11.51	--
0.2	42.1	6.61667	11.04333	33.41739
0.28	42.67667	6.8	11.32667	33.59341
0.34	42.52	6.70333	12.00667	--
0.36	43.55	6.80333	11.98	32.83604
0.38	43.19333	6.77	12.05333	--
0.388	41.96333	6.65	11.66333	33.22334
0.397	41.96	6.55333	11.52667	--
0.403	42.3	6.56	11.37	--
0.415	43.01333	6.68	12.15	--

Tabelle A4: Ertragskoeffizienten bezogen auf Glucose (Y X/S), Sauerstoff (Y X/O) und Kohlendioxid (Y X/CO) sowie der energetischen Biomassekoeffizient (Y ATP) und die ATP-Aubeute pro Sauerstoff (Y ATP/O) von *Escherichia coli* TG1 im Chemostaten unter aeroben, glucoselimitierten Bedingungen

D	Y X/S	Y X/O	Y X/CO	Y ATP	Y ATP/O
1/h	g/g	g/g	g/g	g/mol	mol/mol
0.02	0.50505	--	--	--	--
0.042	0.48395	0.71496	0.74396	7.9568	2.1687
0.066	0.505	0.94453	0.75562	7.5807	2.1686
0.134	0.529	1.10759	0.76716	7.0946	2.1685
0.15	0.51312	1.22718	0.76723	8.9415	2.1690
0.17	0.523	1.10255	0.79869	7.8459	2.1687
0.203	0.541	1.09787	0.79311	8.4702	2.1688
0.265	0.5058	1.23196	0.88813	9.7932	2.1692
0.276	0.5451	1.24533	0.91045	9.2483	2.1690
0.3	0.55313	1.26476	0.92433	9.2569	2.1690
0.347	0.5618	1.33126	0.96819	10.9512	2.1695
0.372	0.58115	1.54052	1.14711	11.7862	2.1697
0.388	0.6037	1.59141	1.15739	11.6807	2.1697
0.397	0.52796	1.34689	0.9988	11.4302	2.1696
0.41	0.53184	--	--	--	--
0.415	0.26787	3.0202	2.14977	--	--

Tabelle A5: Adenosinnucleotide und Energieladung des Adenylatpools (AEC) von *Escherichia*

coli TG1 im Chemostaten unter aeroben, glucoselimitierten Bedingungen

D	AMP	ADP	ATP	AEC
1/h	μmol/l	μmol/l	μmol/l	
0.066	0.13	0.39	4.0625	0.92908
0.134	0.2301	0.585	3.2786	0.87234
0.21	0.4095	0.7202	2.8288	0.80558
0.28	0.55055	0.78	3.1616	0.79062
0.347	1.1349	0.5239	3.0576	0.70383
0.372	0.6812	0.65	2.08	0.70503
0.397	0.0949	0.2639	0.3861	0.69546

Tabelle A6: Glucose, Lactat und Acetatkonzentration im Kulturüberstand während eines Up-Shifts der Durchflußrate von $D = 0,066 \text{ h}^{-1}$ auf $D = 0,23 \text{ h}^{-1}$ zum Zeitpunkt $t = 0$ bei *Escherichia coli* TG1 im Chemostaten unter aeroben, glucoselimitierten Bedingungen

Zeit	Glucose	Lactat	Acetat
h	mol/l	mol/l	mol/l
-0.41667	0	0	0
0	0	0	--
0.00833	0	5.28E-05	--
0.01667	0	1.02E-04	--
0.025	0	8.16E-06	--
0.03333	0	3.20E-06	--
0.05	0	7.76E-05	--
0.08333	4.28E-04	9.74E-05	--
0.16667	7.78E-04	8.75E-05	--
0.3	0.00133	5.77E-05	0
0.50833	0.00239	9.24E-05	--
0.775	0.00346	1.42E-04	--
1.03333	0.00464	1.87E-04	--
2	0.00806	0.00124	0
3.05	0.01033	0.00176	0.00567
4.00833	0.00928	0.00336	0.00933
5.01667	0.00872	0.00273	0.00967
6	0.00536	--	--
9	0	7.60E-04	0.00302
12	0	0	1.00E-03
25	0	0	0

Tabelle A7: Adenosinnucleotide (AMP, ADP, ATP) und AEC während eines Up-Shifts der Durchflußrate von $D = 0,066 \text{ h}^{-1}$ auf $D = 0,23 \text{ h}^{-1}$ zum Zeitpunkt $t = 0$ bei *Escherichia coli* TG1 im Chemostaten unter aeroben, glucoselimitierten Bedingungen

Zeit	AMP	ADP	ATP	cAMP	AEC
min	$\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{mol/l}$	
-45	0.0986	0.801	4.0558	0	0.89928
-10	0.08367	0.8088	4.1384	0	0.90298
0	0.10847	0.8088	4.1408	0	0.8986
0.75	0	0.8745	4.1476	1.15	0.91293
1.25	0	0.76	4.145	1.0917	0.92253
1.75	0	0.765	4.343	1.1114	0.92512
2.25	0	0.678	4.878	1.147	0.93898
2.5	0	0.8016	4.145	1.2127	0.91897
4.5	0.0684	0.9623	3.7549	1.1261	0.88517
9.75	0.1879	1.367	3.444	1.1288	0.82568
17.5	0.3074	1.234	3.2665	1.1308	0.80773
30	0.395	1.24	3.4339	0.9438	0.79976
46.25	0.4	1.323	3.273	0.7813	0.78753
60	0.4176	1.3815	2.6334	0.5836	0.74995
119.25	0.4321	1.3358	3.273	0.4587	0.78179
182.5	0.422	1.187	2.7656	0	0.76786
550	0.422	1.1087	2.576	0	0.7625

Tabelle A8: Adenosinnucleotide (AMP, ADP, ATP) und AEC während eines Down-Shifts der Durchflußrate von $D = 0,23 \text{ h}^{-1}$ auf $D = 0,066 \text{ h}^{-1}$ zum Zeitpunkt $t = 0$ bei *Escherichia coli* TG1 im Chemostaten unter aeroben, glucoselimitierten Bedingungen

Zeit	AMP	ADP	ATP	cAMP	AEC
	$\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{mol/l}$	
-45	0.4648	1.69938	3.36	0	0.76205
-10	0.4449	1.6641	3.251	0	0.76176
0	0.4849	1.6246	3.27428	0	0.75905
0.25	0.39264	1.60124	2.62169	2.04812	0.74147
0.5	0.43129	1.587	2.23826	2.42571	0.71226
0.75	0.46779	1.72189	1.77363	2.60457	0.66474
1	0.45395	2.01637	1.69734	2.73375	0.64917
1.25	0.48078	1.636	1.97138	2.77747	0.68231
1.5	0.42966	1.77302	2.02462	2.93646	0.68865
1.75	0.398	1.76	2.242	2.93648	0.70955
2	0.3559	1.17792	2.6248	3.01993	0.77279
2.5	0.281	0.9234	3.04517	3.103	0.82523
3.5	0.1856	0.961	3.489	3.2078	0.85631
5	0.1261	0.8866	3.4879	3.25388	0.87348
15	0.145	0.796	3.568	3.22781	0.87957
30	0.11976	0.684	3.7926	2.91846	0.89954
60	0.1297	0.598	3.771	1.986	0.90471
119.25	0.131	0.642	3.5795	0.896	0.89615
550	0	0.645	3.176	0	0.91561

Tabelle A9: Methylglyoxalkonzentration bei *Escherichia coli* TG1 während eines Up-Shifts der Durchflußrate von $D = 0,066 \text{ h}^{-1}$ auf (1) $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$ bzw. (2) $D = 0,23 \text{ h}^{-1}$ zum Zeitpunkt $t = 0$ im Chemostaten unter aeroben, glucoselimitierten Bedingungen

Zeit	MGO 1	MGO 2
min	μmol/l	μmol/l
-10	0	0
0	0	0
3	0	---
5	---	0
10	0	---
15	0	8.44
30	2.3634	7.154
60	5.6982	6.674
87	---	8.72
120	4.8758	9.56
180	8.901	12.028
240	8.1814	---
250	---	12.578
300	---	11.2
360	---	9.94
390	---	7.52
1500	0	0

Tabelle A10: Methylglyoxalkonzentration bei *Escherichia coli* TG1 während eines Up-Shifts der Durchflußrate von $D = 0,066 \text{ h}^{-1}$ auf $D = 0,28 \text{ h}^{-1}$ zum Zeitpunkt $t = 0$ im Chemostaten unter aeroben, glucoselimitierten Bedingungen

Zeit	MGO	Zeit	MGO
min	μmol/l	min	μmol/l
-30	0.30506	420	21.07876
0	0.30506	480	10.0147
15	6.62115	540	11.4119
30	7.32559	600	11.04645
45	5.8267	660	12.99203
60	4.59327	720	15.46555
90	7.25017	750	19.18828
120	6.81669	780	10.04318
180	6.37378	840	7.16218
240	7.69114	900	6.19865
300	7.69024	960	6.75671
360	11.95158	990	10.07002

Tabelle A11: Adenosinnucleotide und AEC während einer Oszillation bei $D = 0,28 \text{ h}^{-1}$ bei *Escherichia coli* TG1 im Chemostaten unter aeroben, glucoselimitierten Bedingungen

Zeit	AMP	ADP	ATP	AEC
min	μmol /g _{BTM}	μmol/g _{BTM}	μmol/g _{BTM}	

1025	2.20363	0.21613	6.6538	0.74523
1045	1.75236	2.18798	7.13474	0.743
1070	0.92655	1.8425	8.31588	0.83331
1100	1.23812	0.72349	4.41261	0.74901
1120	2.03259	1.38364	3.09025	0.58128
1165	1.30582	0.79435	3.03996	0.66869
1180	1.46604	0.30379	3.65269	0.70163
1235	1.76233	0.17939	5.33092	0.74534
1295	2.37356	1.94856	6.9485	0.70296
1325	1.42828	2.62901	7.43866	0.76141
1365	0.72	2.20614	8.58861	0.84168

Tabelle A12: Adenosinnucleotide und AEC während der Hitzeinduktion bei zwei unabhängigen Hochzelldichtekultivierungen mit bFGF produzierendem *E.coli* TG1 (pλFGFB); bei t = 0 erfolgte die Induktion der Proteinsynthese durch einen Temperatursprung von 30°C auf 42°C

HDF I					HDF II				
Zeit	AEC	AMP	ADP	ATP	Zeit	AEC	AMP	ADP	ATP
min		μmol/l	μmol/l	μmol/l	min		μmol/l	μmol/l	μmol/l
-1.733	0.829	1.699	4.089	16.066	-1.067	1.445	4.949	14.123	0.809
-0.233	0.823	1.499	4.914	15.951	-0.400	2.010	2.456	15.131	0.835
0.167	0.805	1.678	4.530	14.015	-0.083	1.724	3.601	14.582	0.823
0.333	0.709	4.029	5.269	13.606	0.067	2.784	6.313	14.132	0.744
0.500	0.634	5.639	3.839	11.160	0.167	2.403	5.229	15.430	0.782
0.667	0.730	2.938	2.813	10.344	0.367	4.646	3.553	11.974	0.682
0.833	0.750	2.698	2.364	10.428	0.500	2.235	5.776	11.456	0.737
1.000	0.797	2.227	2.523	12.396	0.667	0.627	5.557	11.392	0.806
1.167	0.797	2.017	2.494	11.584	0.933	1.170	3.016	11.974	0.834
1.333	0.808	1.714	2.433	11.144	1.000	1.285	4.252	12.889	0.815
1.500	0.806	1.460	2.420	9.853	1.247	1.223	1.926	11.560	0.851
1.667	0.780	1.314	2.441	7.777	1.600	0.551	6.464	11.354	0.794
1.833	0.764	1.384	2.437	7.199	1.833	1.345	4.179	11.216	0.795
2.000	0.748	1.582	2.585	7.227	2.000	0.898	6.655	9.497	0.752
3.333	0.732	1.693	3.204	7.398	3.000	2.145	5.019	10.654	0.739
4.000	0.724	1.641	3.228	6.910	4.000	1.623	6.915	9.318	0.715
5.033	0.706	1.566	2.064	5.208					

Tabelle A13: Stoffwechselraten von *Escherichia coli* TG1 im Chemostaten unter aeroben, glucoselimitierte Bedingungen

D	q Gluc	Q Gluc	q O ₂	Q O ₂	q CO ₂	Q CO ₂	q Ac	Q BTM	Q Re	Q* Re	n
1/h	spez mol/gh	mol/lh	spez mol/gh	mol/lh	spez mol/gh	mol/lh	spez mol/gh	g/lh	mol/lh	mol/lh	
0.044	0.0005	0.0024	0.0014	0.00693	0.00134	0.0068	0	0.2231	0.0106	0.0100	
0.066	0.0007	0.0037	0.0018	0.009	0.00194	0.0098	0	0.3333	0.0183	0.0183	
0.134	0.0014	0.0074	0.0034	0.018	0.0038	0.0201	0	0.7089	0.0333	0.0333	
0.15	0.0016	0.0083	0.0037	0.0196	0.0039	0.0208	0	0.8009	0.0304	0.0325	
0.17	0.0018	0.0094	0.0047	0.0248	0.00484	0.0253	0	0.8891	0.0355	0.0383	
0.203	0.0021	0.0113	0.0055	0.0297	0.00536	0.029	0	1.0982	0.0495	0.0488	
0.265	0.0027	0.0147	0.0062	0.034	0.00635	0.0349	0	1.4575	0.0620	0.0602	
0.28	0.0028	0.0156	0.0069	0.0383	0.00702	0.0388	0	1.5484	0.0635	0.0638	
0.3	0.0030	0.0167	0.0074	0.041	0.00739	0.0409	0	1.6594	0.0677	0.0662	
0.347	0.0034	0.0188	0.0077	0.0424	0.00778	0.0428	0	1.9085	0.0747	0.0747	
0.375	0.0036	0.0202	0.0075	0.0429	0.00755	0.0429	0.000053	2.1319	---	---	
0.388	0.0036	0.0210	0.0076	0.0448	0.00762	0.0448	0.000056	2.2814	0.0747	0.0747	
0.397	0.0039	0.0212	0.0082	0.045	0.00837	0.0458	0.000075	2.1716	0.0750	0.0763	
0.41	0.0049	0.0187	0.0027	0.0103	0.00275	0.0105	0.002051	1.5726	0.0172	0.0175	
0.415	0.0088	0.0092	0.0044	0.0046	0.00447	0.0047	0.00999	0.4415	0.0077	0.0078	

Tabelle A14: Stöchiometrie des Glucosemetabolismus bei *Escherichia coli* TG1 im Chemostaten unter aeroben, glucoselimitierten Bedingungen; Aufteilung der Glucose zur Dissimilation (Diss), Assimilation (Ass) und Produktbildung sowie beteiligte Substrate und Produkte (bezogen auf ein mol Glucose)

D	Diss	Produkt	Ass	BTM	NH₃	CO₂	O₂	ATP	H₂O
1/h	mol	mol	mol	mol	mol	mol	mol	mol	mol
0.044	0.443	0.000	0.557	3.341	0.735	2.659	2.624	11.382	4.012
0.066	0.455	0.000	0.545	3.273	0.720	2.727	2.693	11.681	4.053
0.134	0.470	0.000	0.530	3.179	0.699	2.821	2.788	12.090	4.108
0.15	0.416	0.000	0.584	3.504	0.771	2.496	2.459	10.669	3.915
0.17	0.446	0.000	0.554	3.321	0.731	2.679	2.644	11.469	4.024
0.203	0.429	0.000	0.571	3.429	0.754	2.571	2.535	10.999	3.960
0.265	0.395	0.000	0.605	3.629	0.798	2.371	2.332	10.120	3.840
0.28	0.408	0.000	0.592	3.551	0.781	2.449	2.412	10.464	3.887
0.3	0.408	0.000	0.592	3.552	0.781	2.448	2.411	10.459	3.887
0.347	0.370	0.000	0.630	3.781	0.832	2.219	2.180	9.458	3.751
0.375	0.351	0.007	0.641	3.848	0.847	2.122	2.082	9.058	3.681
0.388	0.353	0.008	0.639	3.835	0.844	2.134	2.094	9.112	3.687
0.397	0.357	0.010	0.633	3.799	0.836	2.162	2.123	9.243	3.701
0.412	0.242	0.209	0.549	3.293	0.725	1.870	1.835	8.662	3.204
0.42	-0.105	0.569	0.535	3.213	0.707	0.510	0.476	3.971	1.811

7.3 Stoffflußmodellierung

7.3.1 Reaktionen des biochemischen Stoffwechselmodells

Glucoseaufnahme

R1) Glucose + Phosphoenolpyruvat \rightarrow Glucose-6-Phosphat + Pyruvat

Embden-Meyerhof-Parnas Weg

R2) Glucose-6-Phosphat \rightarrow Fructose-6-Phosphat

R3) Fructose-6-Phosphat + ATP \rightarrow 2 Glycerinaldehydphosphat + ADP

R4) Glycerinaldehydphosphat + ADP + NAD \rightarrow NADH₂ + Glycerin-3-Phosphat + ATP

R5) Glycerin-3-Phosphat \rightarrow Phosphoenolpyruvat + H₂O

R6) Phosphoenolpyruvat + ADP \rightarrow ATP + Pyruvat

Carboxylierungsreaktion

R7) Phosphoenolpyruvat + CO₂ \rightarrow Oxalacetat

TCA Zyklus

R8) Pyruvat + CoA + NAD \rightarrow Acetyl-CoA + CO₂ + NADH

R9) Acetyl-CoA + Oxalacetat + H₂O \rightarrow Isocitrat + CoA

R10) Isocitrat + NADP \rightarrow α -Ketoglutarat + NADPH₂ + CO₂

R11) α -Ketoglutarat + CoA + NAD \rightarrow Succinyl-CoA + CO₂ + NADH₂

R12) Succinyl-CoA + ADP \rightarrow Succinat + CoA + ATP

R13) Succinat + H₂O + FAD \rightarrow Malat + FADH₂

R14) Malat + NAD \rightarrow Oxalacetat + NADH₂

Essigsäurebildung

R15) Acetyl-CoA + ADP \rightarrow Acetat + CoA + ATP

Ammoniumfixierung; Glutamat, Glutamin

R16) NH₃^{EX} + 0,5 ATP \rightarrow NH₃ + 0,5 ADP

R17) NH₃ + α -Ketoglutarat + NADPH₂ \rightarrow Glutamat + H₂O + NADP

R18) Glutamat + NH₃ + ATP \rightarrow Glutamin + ADP

Pentosephosphatzyklus

R19) Glucose-6-Phosphat + H₂O + 2 NADP → Ribulose-5-Phosphat + CO₂ + 2 NADPH₂

R20) Ribulose-5-Phosphat → Ribose-5-Phosphat

R21) Ribulose-5-Phosphat → Xylose-5-Phosphat

R22) Xylose-5-Phosphat + Ribose-5-Phosphat → Sedoheptulose-7-Phosphat +
Glycerinaldehydphosphat

R23) Sedoheptulose-7-Phosphat + Glycerinaldehydphosphat → Fructose-6-Phosphat +
Erythrose-4-Phosphat

R24) Xylose-5-Phosphat + Erythrose-4-Phosphat → Fructose-6-Phosphat +
Glycerinaldehydphosphat

ATP-Generation (P/O = 2)

R25) 2 NADH₂ + O₂ + 4 ADP → 2 H₂O + 4 ATP + 2 NAD

R26) 2 FADH₂ + O₂ + 2 ADP → 2 H₂O + 2 ATP + 2 FAD

Biomassebildung

R27) 0,02 Glucose-6-Phosphat + 0,007 Fructose-6-Phosphat + 0,064 Ribose-5-Phosphat +
0,038 Erythrose-4-Phosphat + 0,013 Glycerinaldehydphosphat + 0,139 Glycerin-3-Phosphat +
0,298 Pyruvat + 0,295 Acetyl-CoA + 0,176 Oxalacetat + 3,325 ATP + 0,355 NAD + 0,633
NADPH₂ + 0,989 Glutamat + 0,025 Glutamin + 0,076 Phosphoenolpyruvat → Biomasse +
0,355 NADH₂ + 0,953 α-Ketoglutarat + 3,325 ADP + 0,633 NADP

Erhaltungsenergie

R28) ATP → ADP

Tabelle A15: Intrazelluläre Stoffflüsse bei *Escherichia coli* TGI normiert auf die Glucoseaufnahme im Chemostaten unter aeroben glucoselimitierten Bedingungen

D [1/h]	0.044	0.066	0.134	0.15	0.17	0.203	0.265	0.28	0.3	0.347	0.375	0.388	0.397	0.41	0.415
Reaktion															
R(1)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
R(2)	57.77	62.42	51.81	49.83	53.78	47.27	45.00	43.65	43.61	40.43	32.68	26.71	37.27	46.09	66.90
R(3)	78.99	80.73	76.74	76.00	77.49	75.04	74.19	73.68	73.66	72.47	69.59	67.35	71.33	75.67	85.34
R(4)	165.97	168.09	163.25	162.35	164.15	161.18	160.14	159.53	159.51	158.06	154.63	151.91	156.76	163.73	178.54
R(5)	153.23	155.71	150.04	148.98	151.09	147.62	146.40	145.68	145.65	143.96	139.99	136.81	142.50	152.04	171.88
R(6)	24.54	27.84	20.29	18.88	21.70	17.07	15.45	14.49	14.46	12.20	7.02	2.79	10.39	25.72	56.89
R(7)	21.73	21.10	22.52	22.79	22.26	23.13	23.43	23.62	23.62	24.05	24.96	25.76	24.31	19.93	11.35
R(8)	97.22	101.31	91.97	90.23	93.71	87.98	85.98	84.79	84.76	81.96	75.63	70.40	79.82	100.67	142.62
R(9)	70.18	75.04	63.94	61.87	66.00	59.19	56.81	55.40	55.36	52.03	43.07	36.77	47.60	34.03	14.58
R(10)	70.18	75.04	63.94	61.87	66.00	59.19	56.81	55.40	55.36	52.03	43.07	36.77	47.60	34.03	14.58
R(11)	64.59	69.61	58.14	56.00	60.27	53.24	50.78	49.32	49.28	45.84	36.64	30.14	41.34	28.90	11.66
R(12)	64.59	69.61	58.14	56.00	60.27	53.24	50.78	49.32	49.28	45.84	36.64	30.14	41.34	28.90	11.66
R(13)	64.59	69.61	58.14	56.00	60.27	53.24	50.78	49.32	49.28	45.84	36.64	30.14	41.34	28.90	11.66
R(14)	64.59	69.61	58.14	56.00	60.27	53.24	50.78	49.32	49.28	45.84	36.64	30.14	41.34	28.90	11.66
R(15)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.49	1.57	1.96	41.84	113.91
R(16)	95.24	92.51	98.74	99.90	97.59	101.40	102.74	103.53	103.55	105.42	109.45	112.92	106.58	87.36	49.76
R(17)	92.95	90.29	96.37	97.50	95.24	98.96	100.26	101.04	101.06	102.88	106.81	110.21	104.02	85.26	48.56
R(18)	2.29	2.23	2.38	2.40	2.35	2.44	2.47	2.49	2.49	2.54	2.63	2.72	2.56	2.10	1.20
R(19)	40.40	35.80	46.29	48.25	44.35	50.77	53.02	54.36	54.40	57.54	65.21	71.12	60.68	52.23	32.15
R(20)	18.54	16.86	20.69	21.40	19.98	22.32	23.15	23.63	23.65	24.79	27.57	29.72	25.90	22.06	13.37
R(21)	21.86	18.94	25.60	26.85	24.37	28.45	29.88	30.72	30.75	32.74	37.65	41.40	34.78	30.17	18.78
R(22)	12.67	11.16	14.61	15.25	13.97	16.08	16.82	17.26	17.27	18.30	20.82	22.76	19.34	16.68	10.30
R(23)	12.67	11.16	14.61	15.25	13.97	16.08	16.82	17.26	17.27	18.30	20.82	22.76	19.34	16.68	10.30
R(24)	9.19	7.78	11.00	11.60	10.40	12.37	13.06	13.47	13.48	14.44	16.82	18.63	15.44	13.49	8.48
R(25)	212.45	220.12	202.62	199.36	205.87	195.15	191.40	189.17	189.10	183.86	170.47	160.59	177.84	176.02	180.75
R(26)	32.29	34.81	29.07	28.00	30.13	26.62	25.39	24.66	24.64	22.92	18.32	15.07	20.67	14.45	5.83
R(27)	91.67	89.04	95.04	96.15	93.92	97.60	98.88	99.64	99.67	101.46	105.34	108.68	102.58	84.08	47.89
R(28)	735.80	790.34	665.82	642.59	688.94	612.63	585.94	570.08	569.59	532.32	441.10	371.01	494.87	592.14	825.01

Tabelle A16: Intrazelluläre Stoffflüsse bei *Escherichia coli* TGI im Chemostaten unter aeroben, glucoselimitierten Bedingungen

D [1/h]	0.044	0.066	0.134	0.15	0.17	0.203	0.265	0.28	0.3	0.347	0.375	0.388	0.397	0.41	0.415
Reaktion	mol/(g h)	mol/(g h)	mol/(g h)	mol/(g h)	mol/(g h)	mol/(g h)	mol/(g h)	mol/(g h)	mol/(g h)	mol/(g h)	mol/(g h)	mol/(g h)	mol/(g h)	mol/(g h)	mol/(g h)
R(1)	0.480	0.730	1.410	1.560	1.810	2.080	2.680	2.810	3.010	3.420	3.560	3.570	3.870	4.900	8.770
R(2)	0.277	0.456	0.730	0.777	0.973	0.983	1.206	1.227	1.313	1.383	1.163	0.954	1.442	2.258	5.867
R(3)	0.379	0.589	1.082	1.186	1.402	1.561	1.988	2.070	2.217	2.478	2.477	2.404	2.760	3.708	7.484
R(4)	0.797	1.227	2.302	2.533	2.971	3.353	4.292	4.483	4.801	5.406	5.505	5.423	6.067	8.023	15.658
R(5)	0.735	1.137	2.116	2.324	2.735	3.070	3.924	4.094	4.384	4.923	4.984	4.884	5.515	7.450	15.074
R(6)	0.118	0.203	0.286	0.295	0.393	0.355	0.414	0.407	0.435	0.417	0.250	0.100	0.402	1.260	4.990
R(7)	0.104	0.154	0.318	0.356	0.403	0.481	0.628	0.664	0.711	0.822	0.889	0.920	0.941	0.976	0.995
R(8)	0.467	0.740	1.297	1.408	1.696	1.830	2.304	2.383	2.551	2.803	2.692	2.513	3.089	4.933	12.508
R(9)	0.337	0.548	0.902	0.965	1.195	1.231	1.523	1.557	1.666	1.779	1.533	1.313	1.842	1.667	1.279
R(10)	0.337	0.548	0.902	0.965	1.195	1.231	1.523	1.557	1.666	1.779	1.533	1.313	1.842	1.667	1.279
R(11)	0.310	0.508	0.820	0.874	1.091	1.107	1.361	1.386	1.483	1.568	1.304	1.076	1.600	1.416	1.023
R(12)	0.310	0.508	0.820	0.874	1.091	1.107	1.361	1.386	1.483	1.568	1.304	1.076	1.600	1.416	1.023
R(13)	0.310	0.508	0.820	0.874	1.091	1.107	1.361	1.386	1.483	1.568	1.304	1.076	1.600	1.416	1.023
R(14)	0.310	0.508	0.820	0.874	1.091	1.107	1.361	1.386	1.483	1.568	1.304	1.076	1.600	1.416	1.023
R(15)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.053	0.056	0.076	2.050	9.990
R(16)	0.457	0.675	1.392	1.559	1.766	2.109	2.753	2.909	3.117	3.605	3.896	4.031	4.125	4.281	4.364
R(17)	0.446	0.659	1.359	1.521	1.724	2.058	2.687	2.839	3.042	3.519	3.803	3.934	4.026	4.178	4.259
R(18)	0.011	0.016	0.034	0.038	0.043	0.051	0.066	0.070	0.075	0.087	0.094	0.097	0.099	0.103	0.105
R(19)	0.194	0.261	0.653	0.753	0.803	1.056	1.421	1.527	1.637	1.968	2.322	2.539	2.348	2.559	2.819
R(20)	0.089	0.123	0.292	0.334	0.362	0.464	0.620	0.664	0.712	0.848	0.981	1.061	1.002	1.081	1.172
R(21)	0.105	0.138	0.361	0.419	0.441	0.592	0.801	0.863	0.926	1.120	1.340	1.478	1.346	1.478	1.647
R(22)	0.061	0.081	0.206	0.238	0.253	0.334	0.451	0.485	0.520	0.626	0.741	0.813	0.748	0.817	0.903
R(23)	0.061	0.081	0.206	0.238	0.253	0.334	0.451	0.485	0.520	0.626	0.741	0.813	0.748	0.817	0.903
R(24)	0.044	0.057	0.155	0.181	0.188	0.257	0.350	0.378	0.406	0.494	0.599	0.665	0.598	0.661	0.744
R(25)	1.020	1.607	2.857	3.110	3.726	4.059	5.129	5.316	5.692	6.288	6.069	5.733	6.882	8.625	15.851
R(26)	0.155	0.254	0.410	0.437	0.545	0.554	0.680	0.693	0.742	0.784	0.652	0.538	0.800	0.708	0.511
R(27)	0.440	0.650	1.340	1.500	1.700	2.030	2.650	2.800	3.000	3.470	3.750	3.880	3.970	4.120	4.200
R(28)	3.532	5.769	9.388	10.024	12.470	12.743	15.703	16.019	17.145	18.205	15.703	13.245	19.152	29.015	72.353

Lebenslauf
Anke N. Kayser

Geburtsdatum/-ort:	30.09.68	geboren in Lübeck
Schulbildung:	08/74 - 07/78	Grund- und Hauptschule Sereetz
	08/78 - 05/87	Gymnasium am Mühlenberg in Bad Schwartau
		Abschluß: Abitur
Praktika:	10/87 - 01/88	Praktikum in der tierärztlichen Klinik Dr. Wrieg, Lübeck
	02/88 - 07/88	Bürohilfskraft für Datenverarbeitung im Ingenieur-Kontor zu Lübeck
Studium:	10/88 - 09/94	Studium der Biologie an der Technische Universität Braunschweig
	01/94 - 09/94	Anfertigung der Diplomarbeit in der Enzymologie an der Gesellschaft für biotechnologische Forschung mbH, BS
	09/94	Diplom der Biologie
Promotion:	12/94 - 10/98	Anfertigung der Doktorarbeit in der Bioverfahrenstechnik an der Gesellschaft für biotechnologische Forschung mbH, BS